

ATTUALITÀ SCIENTIFICHE — SERIE MEDICA

DIRETTA DAL PROF. A. LUSTIG - SENATORE DEL REGNO

GIUSEPPE LEVI

DELLA R. UNIVERSITÀ DI TORINO

VITA AUTONOMA
DI PARTI DELL'ORGANISMO

LA COLTIVAZIONE DEI TESSUTI

CON 35 FIGURE NEL TESTO



Handwritten signature or mark.

BOLOGNA

N. 8

NICOLA ZANICHELLI

EDITORE



ATTUALITÀ SCIENTIFICHE

SERIE MEDICA

DIRETTA DAL SENATORE PROF. A. LUSTIG

Volumi pubblicati:

MENDES G. - Moderni mezzi diagnostici dell'infezione tubercolare.

ILVENTO A. - La difesa della salute e la scuola.

RONDONI P. - Immunità e terapia specifica nella tubercolosi.

LURÀ G. - La cura della tisi polmonare col pneumotorace artificiale.

ILVENTO A. - La tubercolosi malattia sociale.

FRANCHETTI A. - La difesa contro la tubercolosi e la sua legislazione.

LEVI G. - Vita autonoma di parti dell'organismo. (*La coltivazione dei tessuti*).

In preparazione:

PUTTI V. - Tubercolosi ossea e articolare. Diagnosi e cura.

MENDES G. - Sanatori e tubercolosi.

GRIXONI G. - La pratica della depurazione di acque potabili.

HERLITZKA A. - Fisiologia ed aviazione.

CORSINI A. - Medici ciarlatani e ciarlatani medici.

GIUSEPPE LEVI

DELLA R. UNIVERSITÀ DI TORINO

VITA AUTONOMA DI PARTI DELL'ORGANISMO

LA COLTIVAZIONE DEI TESSUTI

CON 35 FIGURE NEL TESTO



foa

BOLOGNA

NICOLA ZANICHELLI

EDITORE

L'EDITORE ADEMPIUTI I DOVERI
ESERCITERÀ I DIRITTI SANCITI DALLE LEGGI

CAP. I.

Indipendenza fra morte di un organismo e delle sue parti - Sopravvivenza di organi isolati.

Un organismo vivente rappresenta un'individualità unitaria morfologica e fisiologica, caratterizzata da determinate proprietà, di cui le più essenziali sarebbero, secondo O. Hertwig: di essere dotata delle funzioni generali della vita; di costituire la propria forma, di conservarla, malgrado le variazioni del mondo esterno, e di ricostituirla.

Child considera come tipici delle individualità organiche gli attributi seguenti: 1° di essere formate di materia vivente, cioè di protoplasma; 2° di avere una grandezza ed una morfologia definita, inoltre una forma visibile, che è associata ad un'attività, dinamica e chimica; 3° un vario grado di ordine, coordinazione, correlazione ed armonia.

Il principio dell'individualità degli organismi è antichissimo e prevalse quasi senza contrasto per secoli. Anzi questo concetto si è affermato molto prima che le scoperte dell'Anatomia e della Fisiologia ci rilevassero, che gli organismi sono costituiti da parti di forma, struttura e funzione diversa.

Collo svolgersi della dottrina cellulare, al principio dell'individualità dell'organismo si sostituiva a poco a poco, durante il secolo XIX, una nuova ipotesi, che tendeva a considerare quest'ultimo come un complesso di unità microscopiche, le cellule, ciascuna delle quali sarebbe stata dotata di un certo grado di autonomia; un'individualità organica veniva rappresentata come un'associazione di organismi elementari, riuniti in una specie di comunità sociale fondata sulla divisione del lavoro.

Oggi la definizione di « stato cellulare », che rispecchia la tendenza prevalente durante il secolo scorso, di porre in ombra l'individualità dell'organismo di fronte a quella dei suoi elementi costitutivi, non è più accettata incondizionatamente; anzi sempre più si propende a considerare un organismo come un tutto morfologicamente e funzionalmente unitario; le ricerche di Driesch nel dominio della Morfologia causale, e quelle sugli ormoni nel campo della Fisiologia sperimentale, hanno più di altre contribuito a far accettare il principio, che la forma e la funzione delle parti sono collegate a quella del tutto ⁽¹⁾.

Però il concetto dell'unità morfologica e fisiologica dei singoli organismi non ci può far dimenticare i fatti, dai quali emerge, che l'organismo è costituito di parti, di forma, di struttura e funzione diversa; e che sebbene queste parti agiscano sinergicamente, in modo che le manifestazioni vitali del tutto rappresentano la risultante di quelle singole delle sue parti, e le più strette correlazioni sussistono fra le funzioni individuali delle varie parti, esse sono sempre dotate di un certo grado di autonomia; quest'è di varia entità nei differenti animali e nei singoli periodi dello sviluppo embrionario. Altissima durante le prime fasi dell'ontogenesi, nelle quali si vanno costituendo gli abbozzi degli organi (1° periodo degli abbozzi indipendenti secondo Roux), decresce sempre più coll'istituirsi delle correlazioni fisiologiche fra gli organi, per opera degli ormoni circolanti nei liquidi nutritivi.

Si tratta di un argomento vastissimo, al quale si ricollegano i più fondamentali problemi della Biologia, e che può essere illustrato da punti di vista diversi.

Noi ci limiteremo a prospettare un solo lato della questione dell'autonomia delle parti di fronte all'individuo; quali sono le condizioni più favorevoli per la vita propria delle parti di un organismo, quando sono separate dal tutto, e come si modificano la forma, la struttura e le manifestazioni funzionali delle medesime in queste condizioni.

⁽¹⁾ Whitman si è spinto tant'oltre in quest'ordine di idee sino ad affermare « che il tutto determina le sue parti e che l'organizzazione precede la struttura ».

Prima di entrare in argomento, è indispensabile che ci orientiamo sui criterî che, secondo me, debbono essere seguiti dal Morfologo nell'analisi dei rapporti esistenti fra l'organismo e le sue parti, macro e microscopiche. Secondo la classificazione dell'Anatomia descrittiva, un organismo è scomponibile nei suoi costituenti elementari, le cellule, che sono alla loro volta riunite in organi, strumenti della funzione, i quali si distinguono per forma, struttura, maniera di origine e funzione.

Organi destinati ad un ufficio fisiologico simile, e provenienti da un abbozzo comune, sono riuniti in gruppi denominati apparecchi. Ma è evidente che questo raggruppamento, di valore puramente didattico, è destituito di contenuto scientifico.

A Häckel si deve la prima suddivisione dell'organismo, fondata su criteri morfologici, in una serie di individualità: cellule, organi, antimeri, metameri, persone.

Seguendo invece le idee di Wiesner e Heidenhain, noi suddivideremo la sostanza organizzata in individualità morfologiche, le quali si possono seriare in ordine ascendente; ciascun ordine superiore è costituito dalla combinazione delle unità di ordine inferiore. Le individualità elementari, le cellule, sono riunite in un organismo adulto in aggregati morfologicamente e funzionalmente unitari, quali i tubuli e gli alveoli ghiandolari, gli alveoli polmonari, i tubuli seminiferi ecc.; le unità d'ordine superiore alle precedenti sono rappresentate dai lobuli di varie ghiandole (del fegato, del rene, ecc.), dai villi intestinali, dalle papille linguali, ecc.

In alcuni organi queste sono riunite a costituire unità di ordine superiore (lobi renali).

Infine le unità di quint'ordine sono rappresentate dagli organi, il complesso dei quali costituisce l'individualità più alta del mondo organizzato, l'organismo.

Nonostante le intime correlazioni esistenti fra le varie parti di quest'individualità superiore, parti microscopiche, od aggregati cellulari d'ordine superiore, *vita e morte di un individuo non sono sempre e di necessità, in stretto rapporto di dipendenza dalla vita e dalla morte delle singole parti.*

Il problema può essere considerato sotto due aspetti diversi:

1° un organismo può continuare a vivere anche se alcune sue parti hanno cessato di esistere; la morte dei singoli elementi dei tessuti e la loro sostituzione da parte delle cellule sopravvivenenti, rappresentano un fatto fisiologico.

Perfino negli organismi unicellulari cospicue parti del corpo, quali il peristoma e l'apparato ciliare, ed anche organi essenziali, come il macronucleo, vanno perdute per ricostituirsi più tardi.

Nelle piante la morte e l'eliminazione di parti, che successivamente si riformano, avviene su larghissima scala; basti ricordare la caduta delle foglie e la morte di porzioni estese di vari arbusti.

E così pure in quasi tutti i Metazoi le cellule di vari tessuti hanno una vita più effimera di quella dell'individuo di cui fanno parte, e vengono sostituite, per l'attività proliferativa degli elementi giovani, persistenti durante tutta la vita in alcune regioni di quei tessuti; questi tessuti per tale proprietà furono chiamati da Bizzozzero « ad elementi labili ».

Fra questi vanno annoverati anzitutto gli elementi del sangue, ed in particolar modo i globuli rossi.

Nel tegumento e negli organi derivati dal tegumento dell'uomo e degli animali superiori a vita terrestre, come pure in alcune mucose, il rinnovamento delle cellule è più appariscente: le cellule più superficiali dell'epidermide, perdono acqua, si imbevono di una speciale sostanza cornea, ed acquistano così una consistenza sempre maggiore; questa metamorfosi culmina colla morte delle cellule, e gli elementi corneificati e morti costituiscono in complesso uno strato molto resistente, al quale spetta una funzione protettiva; per l'usura continua a cui l'epidermide è sottoposta, gruppi di cellule morte, disseccate e corneificate sono di continuo eliminate e sostituite da altre, le quali sottostanno ad una trasformazione analoga negli strati sottostanti.

Fenomeni che si svolgono con particolarità diverse, ma non dissimili nella loro essenza, conducono all'accrescimento dei peli, delle unghie, delle piume e di altre formazioni cutanee, che sono in gran parte costituite adunque, da cellule che hanno cessato di vivere.

In altri animali, non più elementi singoli disseminati nei

tessuti, ma masse cospicue di sostanza vivente, muoiono senza che la vita dell' organismo per questo si arresti; però il fenomeno non si produce continuamente, come negli organi ad elementi labili di Vertebrati, ma avviene soltanto durante una fase determinata dello sviluppo dell' animale; alludo all' eliminazione di intere parti del corpo e di parti di organi, che caratterizzano la metamorfosi larvale di molti animali (Pesci, Anfibi, Artropodi, Echinodermi). Quest' è specialmente evidente negli insetti (Farfalle, Api, ecc.), nei quali la forma della larva ed anche il modo con cui questa si nutre, si muove e si orienta, sono straordinariamente diversi da quella dell' insetto adulto; gli organi destinati a tali funzioni debbono perciò essere diversissimi.

L' antico tegumento della larva muore e viene eliminato, per essere sostituito da un nuovo tegumento formatosi a spese di gruppi di cellule indifferenziate, che esistevano nella larva (dischi dell' imago).

Fenomeni analoghi conducono alla morte ed all' eliminazione dell' epitelio intestinale della larva.

Negli insetti la disgregazione degli organi larvali avviene per attività dei leucociti, i quali vi penetrano in gran numero. Anche durante la muta dei Crostacei avviene la morte e l' emissione di estese parti del corpo, il che permette l' accrescimento periodico di questi animali.

Parti anche più estese del corpo regrediscono e sono eliminate durante la metamorfosi larvale degli Echinodermi. Anche in animali a completo sviluppo può avvenire un' emissione spontanea di intere parti (autotomia), le quali più tardi si ricostituiscono; così nell' Idra, si ha un' eliminazione di tentacoli, in Pennaria vengono emessi tubicini del perisarco ecc.

Mentre negli esempi fin qui addotti la perdita di cellule e di complessi cellulari è compresa nell' ambito della funzione normale dell' organismo, in numerosissimi casi, la distruzione di gruppi cellulari e di intere parti dell' individuo rappresenta per quest' ultimo un fenomeno abnorme, pur essendo essa compatibile colla vita.

In vari animali, l' inanizione protratta determina una regressione di un numero grandissimo di cellule dei tessuti; in un Verme, nella Planaria, le ricerche di Schultz e di Child hanno

dimostrato, che per effetto di questa distruzione il corpo può ridursi ad $\frac{1}{16}$ del volume primitivo. Ebbene ciononostante l'individuo continua a vivere, e se è rialimentato, può riacquistare la grandezza primitiva.

Parimenti la soppressione di estese parti del corpo è compatibile colla vita; ad es. la mutilazione di un arto o della coda di un Vertebrato. Questa non avviene solamente per effetto di interventi sperimentali, ma può prodursi accidentalmente in natura; negli Anfibi e specialmente nei Rettili, come pure nei Crostacei, le mutilazioni di appendici sono straordinariamente frequenti.

In molti animali la parte distrutta viene sostituita più o meno completamente per attività rigenerativa dei tessuti dell'individuo nel punto in cui la mutilazione avvenne; in altri invece la rigenerazione è incompleta, oppure il tessuto ricostituito appare con caratteri diversi da quello originario; od in altri infine ogni processo rigenerativo fa difetto.

Ma ciò ha importanza accessoria per il punto di vista che noi prospettiamo. Venga o no sostituita la parte mancante, *ciò che ha maggiore importanza dal nostro punto di vista, è che un individuo può continuare a vivere anche se parti molte estese del proprio corpo furono da esso separate.*

Ora a noi importa di stabilire qual'è la quantità di sostanza organizzata che può venire sottratta ad un organismo, senza che la vita di quest'ultimo sia compromessa.

Nei Vertebrati il problema si affaccia in modo relativamente semplice; un Vertebrato può continuare ad esistere come individuo finchè non vengano asportati gli organi più essenziali alla sua vita; esso può essere privato della coda e di tutti gli arti, come pure di alcuni visceri o di parti di questi; l'estirpazione di un rene di un Mammifero è compensata da una maggior funzione dell'altro rene; l'estirpazione di estese parti di fegato è compensata da ipertrofia della parte rimanente.

Così pure la vita di moltissimi organismi (e fra questi anche l'uomo) può continuare dopochè furono distrutte estese parti dell'encefalo.

Non occorre aggiungere che le funzioni in queste condizioni non si svolgono più normalmente; a seconda della maggior o

minor dignità fisiologica delle parti estirpate, la funzione normale del tutto sarà in vario grado compromessa.

Ma in vari Invertebrati la questione si presenta più complessa. Nei più bassi Celenterati (Spugne, Polipi, Idroidi) il corpo può essere suddiviso in molti frammenti anche piccolissimi, ciascuno dei quali continua a vivere e riforma un organismo completo.

Così pure alcuni Vermi possono essere decomposti in parti, ciascuna delle quali continua a vivere ed anzi ricostituisce tutto il corpo; ed una notissima esperienza di Driesch ha dimostrato, che dei pezzetti separati di uno stolone di *Clavellina* (un Tunicato) riformano un individuo intero.

In tali casi ciascuna parte rappresenta in potenza un' individualità organica completa, mentre all'opposto se la parte separata dall'organismo, pur continuando a vivere, non è in grado di ricostituirlo, non ha il valore di un'individualità; cosicchè se un Verme od una Ascidia è stata suddivisa in vari frammenti vitali, ma non capaci di formare nuovi individui completi, esso cessa di esistere come tale.

2° Ma sotto un altro punto di vista si presenta il problema del rapporto fra la vita dell'individuo e quella delle sue parti.

Quando un organismo cessa di esistere, è evidente che la vita si arresta contemporaneamente in tutti i suoi elementi costitutivi.

Anzi noi sappiamo che, almeno nell'uomo e negli organismi superiori, la morte dell'individuo può essere la conseguenza solamente di un arresto nelle funzioni dei centri nervosi, che presiedono al ritmo cardiaco e respiratorio; tutti gli altri organi dell'individuo sono all'atto della morte viventi e sopravvivono per qualche tempo.

Sebbene questa nozione rappresenti una conquista relativamente recente, varî fatti desunti dall'esperienza d'ogni giorno attestavano da tempo, che la vita non si spegne contemporaneamente in tutto l'organismo; valgano per tutti l'esempio della coda di lucertola tagliata o dei frammenti del corpo del biacco, i quali continuano a muoversi vivacemente per lungo tempo; il che prova limpidamente la vita autonoma dei centri motori

spinali, persistente dopo la morte dell' individuo. La sopravvivenza di alcune parti del tutto è dimostrata pure dalla persistenza della contrattilità, ben nota già agli antichi fisiologi, da parte di muscoli isolati striati e lisci anche dopo la morte.

Ma è evidente che questo stato di sopravvivenza negli organi, i quali non sono più alimentati dai materiali nutritivi liquidi o gassosi, che prima erano ad essi addotti dal plasma sanguigno e dai globuli rossi, e nei quali si vanno accumulando i prodotti catabolici, non più eliminati dalla corrente circolatoria, non si può protrarre a lungo, e tutte le cellule dell' organismo finiscono per essere distrutte per l' azione dei batteri della putrefazione, oppure, se le parti dell' organismo furono preservate dai germi, per autodigestione da parte dei fermenti autolitici, per quanto non contemporaneamente; perchè i singoli organi di uno stesso individuo sono dotati di un vario grado di resistenza alla morte.

Tali differenze sono specialmente manifeste in Vertebrati inferiori ai Mammiferi.

Il cuore di Anfibi e Rettili sopravvive all' individuo più di qualsiasi altro organo; che il cuore di Rana isolato può continuare a pulsare per molti giorni dopochè fu estratto dall' organismo, noi sappiamo da oltre mezzo secolo, dopo le ricerche di Kronecker, compiute nell' istituto di Ludwig.

Il cuore di Testuggine isolato può pulsare molto più a lungo, per più di tre settimane dopo che fu estratto dall' animale (Fano), purchè naturalmente sia mantenuto in ambiente umido.

Per conservare la contrattilità ritmica del cuore di Mammiferi, è indispensabile di ricorrere a qualche accorgimento tecnico (Langerdorff); le ben note ricerche di Kubialko hanno dimostrato, che facendo circolare nel cuore umano, perfino 24 ore dopo la morte, un liquido nutritivo salino riscaldato a 37°, l' organo ricomincia a pulsare ritmicamente.

La singolare resistenza alla morte delle fibre del miocardio, è attestata dal fatto interessante illustrato da Cesaris-Demel, che il cuore umano può pulsare, persino quando all' osservazione microscopica appare, che nelle sue fibre si sono iniziate le alterazioni inerenti alla putrefazione cadaverica.

Cosicchè il ristabilirsi del ritmo contrattile nel cuore di Mammiferi molte ore dopo la morte, quando siano ristabilite

in esso le condizioni di nutrizione opportune, dimostra evidentemente, che la vita di quest' organo non si era spenta. E le ricerche compiute colla perfusione del cuore e di altri organi con soluzioni saline provano, che per il prolungarsi della vita o per l' estrinsecazione delle sue funzioni, non è tanto indispensabile la presenza in seno ai tessuti di sostanze nutritive proteiche, quando quella di alcuni elettroliti (ione sodio, potassio e calcio) in concentrazione determinata (formule di Ringer, di Locke, di Tyrode, di Herlitzka), nonchè il lavaggio con un liquido che allontani dai tessuti i prodotti catabolici.

La perfusione con questi liquidi fu pure impiegata per ristabilire la funzione dei centri nervosi di Rana, come pure del fegato e di altre ghiandole, dopo la morte dell' individuo.

Un' ingegnosa esperienza di Carrel prova, che con accorgimenti tecnici più perfetti ci è dato di ristabilire un certo grado di coordinazione fra i vari organi anche dopo la morte di un organismo. Dopo asportati tutti i visceri toracici ed addominali di un gatto, questi furono collocati in un termostato di vetro riempito di liquido di Ringer e mantenuto alla temperatura del corpo; nei vasi dei vari organi fu fatto circolare del siero di sangue, mentre i polmoni erano fatti funzionare artificialmente.

Allora il cuore incominciò a pulsare, le sostanze alimentari contenute nell' intestino erano assorbite, i reni eliminavano dell' orina. E la vita e la funzione dei visceri mantenuti nelle condizioni suddette continuò per 24 ore.

Un altro gruppo di ricerche di Carrel dimostrò, che se degli organi vengono preservati dall' inquinamento coi germi e se vengono mantenuti a bassa temperatura, la loro vita si può protrarre per un tempo molto più lungo di quanto si supponesse; dei reni di cani tolti con cautele asettiche furono conservati in ghiacciaia per oltre un mese e successivamente furono innestati con successo in un nuovo ospite; il che prova, che durante questo lungo periodo, la vita degli elementi costitutivi non si era spenta.

L' autonomia delle parti isolate dall' organismo è di grado ancor più alto che negli esempi riferiti, se esse appartengono ad organismi inferiori e ad embrioni.

Non ritornerò sul comportamento delle parti isolate dal

corpo di molti Invertebrati (Spugne, Polipi, Idroidi, di alcuni Vermi e Tunicati, vedi pag. 7), le quali parti hanno il potere oltre che di sopravvivere, di ricostituire tutto l'organismo.

Anche dei frammenti di larve di Anfibi isolati, sopravvivono (Börn, Guardina, ecc.).

Specialmente interessante da questo punto di vista è la recente esperienza di Ekman: fu asportato da un embrione di rospo molto precoce, l'abbozzo del cuore. Un frammento di tegumento che ad esso aderisce si accresce e lo ricopre completamente; si costituisce una vescichetta, nella quale il cuore prosegue nel suo sviluppo, come se avesse mantenuta la sua sede normale nell'embrione, ed ad un certo momento incomincia a pulsare.

RIASSUNTO

Vita e morte di un organismo e delle sue parti non sono necessariamente in intimo rapporto di dipendenza.

Un organismo può continuare a vivere anche dopo la morte di alcune sue parti; in quasi tutti gli animali, elementi microscopici e talora parti estese muoiono e sono eliminate per essere sostituite da cellule più giovani.

D'altra parte nel momento in cui la vita di un individuo si arresta, non tutti gli organi di necessità muoiono contemporaneamente; anzi alcuni organi più resistenti possono sopravvivere all'individuo per lungo tempo.

CAP. II.

Sopravvivenza di frammenti di tessuti isolati dall'organismo - Accrescimento di tessuti "in vitro",,

La dottrina cellulare presuppone, che ciascun elemento costitutivo microscopico degli organi sia dotato di vita propria, cosicchè ogni cellula dovrebbe essere in grado di continuare a vivere anche se isolata.

In pratica, sin poco più di una diecina di anni or sono era difficile realizzare questa condizione per gli elementi dei tessuti, perchè non si riusciva quasi mai a conservarli integri durante le manipolazioni necessarie per separarli dalle loro vicendevoli connessioni.

Invece per gli elementi dei Metazoi, che vivono liberamente sospesi in un liquido, osservazioni antiche e recenti provano, che una sopravvivenza relativamente lunga al difuori dell'organismo è possibile.

E fra questi più di tutti gli altri resistenti si palesarono gli spermatozoi.

In frammenti di testicolo di *Cavia* conservati alla temperatura di 0° furono trovati da Schoede degli spermatozoi-viventi dopo 11 giorni.

La sopravvivenza degli spermatozoi nelle vie genitali della donna è un fatto di dominio comune. Hausmann e Periniy trovarono spermatozoi mobili nell'utero di una donna 8 giorni e mezzo dopo la coabitazione. Ma è dubbio che questi elementi conservino nella specie umana il potere di fecondare per un periodo di tempo così lungo; anzi i dati più recenti sui rapporti fra ovulazione e fecondazione, desunti soprattutto dall'età dei più giovani embrioni umani, lasciano supporre, che il potere fecondante degli spermatozoi non duri a lungo. Invece gli sper-

matozoi di Chiroatteri sopravvivono, e per di più conservano il potere fecondante per molti mesi.

Questi animali si accoppiano nell'autunno; le femmine mantengono lo sperma nella tuba durante tutto il periodo di ibernazione, che, come è noto, si protrae per tutto l'inverno; solamente nel marzo od ai primi d'aprile avviene la fecondazione.

E' noto, che nell'ape regina la fecondazione avviene una volta nella vita durante il volo nuziale, e lo sperma viene conservato nel *receptaculum seminis* per almeno tre anni.

Nella femmina della Salamandra maculosa il seme rimane senza perdere il potere fecondante nelle invaginazioni della parete cloacale per due anni.

Ma anche per altri elementi era conosciuta da tempo la possibilità di una lunga sopravvivenza.

I leucociti della Rana e di altri animali a sangue freddo (Tritone, Testuggine), se mantenuti in camera umida, conservano la proprietà del movimento ameboide per molti giorni, sino a 12 (Hayem e Henocque, Ranvier, Salvioli, Cardile ecc.).

Negli animali a sangue caldo il movimento ameboide dei leucociti si arresta dopo 24 ore circa.

Jolly provò, che i globuli rossi di Tritone possono sopravvivere per un periodo lunghissimo; sin dal 1904 quest' A. aveva constatata la divisione per mitosi di questi elementi 8 giorni dopo che il sangue era stato estratto. E successivamente (1910) mantenendo in ghiacciaia il sangue dentro un tubo di vetro chiuso alla fiamma, constatò movimenti ameboidi di leucociti di Rana conservati nelle condizioni suddette dopo 10 mesi. E perfino elementi molto labili, quali i globuli rossi di Mammiferi, se mantenuti a bassa temperatura, rimangono viventi; De Cornu praticò la trasfusione di sangue di cane, mantenuto in ghiacciaia per otto giorni, senza che si determinasse emoglobinuria; il che prova, che i globuli rossi si erano conservati durante questo periodo, almeno nella loro grande maggioranza, viventi.

Invece le cellule dei tessuti, se dissociate artificialmente, sopravvivono solamente per pochi istanti in condizioni ordinarie; ed è superfluo insistere ad illustrare, come la rottura delle naturali connessioni cogli elementi vicini, anche prescin-

dendo dai traumatismi a cui furono sottoposti nelle dilacerazioni, non può a meno di essere pernicioso per la loro vita.

Ma se invece di isolare le singole cellule di un organo, noi le suddividiamo in parti anche molto piccole, ma costituite sempre da un aggregato di molte cellule e le conserviamo in liquidi isotonici (siero di sangue, liquido ascitico, soluzioni saline isotoniche) queste parti possono talora vivere a lungo.

Certamente i tessuti embrionali godono di un grado di autonomia più elevato di quelle di un organismo adulto, cosicchè essi sopravvivono ancor più, se separati dal tutto.

Ciò apparve manifesto sin da quando Roux applicò il metodo sperimentale alla soluzione di problemi embriologici, colla sua celebre esperienza di esportazione di un blastomero di uovo di Rana, che rappresenta la prima prova dell'autonomia di una parte del germe di fronte al tutto.

Fra le molte indagini che diedero la riprova dell'autonomia di particelle di organi dell'embrione ricorderò, perchè più strettamente attinente all'argomento di cui mi occupo, quella di Born.

Suddividendo una larva di Rana in piccoli frammenti, questi continuano a vivere; fu il caso che condusse l'insigne embriologo di Breslavia a questa constatazione; dei pezzetti di larve erano state abbandonate in una vaschetta; l'indomani Born scoperse che questi frammenti vivevano tuttora, e che per di più l'epitelio rigenerando aveva ricoperto la superficie delle piccole ferite; e neppure nei giorni successivi la vita in queste particelle isolate si arrestava!

L'illustrazione di questo fatto, apparentemente d'interesse accessorio, fu di grande portata, perchè spianò la via alla moderna tecnica delle colture, come pure alle indagini sulla concrescenza di embrioni di Anfibi e sugli innesti di abbozzi embrionali compiute nell'ultimo ventennio da Born, da Harrison, da Braus, da Spemann, da Giardina. Ma ancora prima che le ricerche di Embriologia sperimentale acquistassero una tanto grande estensione, era noto, che la vita di singole cellule e di gruppi di cellule riunite in un frammento di tessuto di un individuo adulto non si arresta contemporaneamente alla morte dell'organismo.

Engelmann constatò, che le cilia delle cellule dell'epitelio.

tracheale sono dotate di movimenti vibratili sin tre giorni dopo la morte; ed in frammenti di polipi nasali estirpati, conservati in ghiacciaia, furono osservati movimenti delle cilia sin 18 giorni dopo l'estirpazione, sebbene in una parte del tumore fosse iniziata la putrefazione (Busse). Così pure nell'epididimo di vari Mammiferi fu constatata la persistenza del movimento delle cilia parecchi giorni dopochè l'organo era stato asportato.

Ed il periodo di sopravvivenza ha una durata anche più lunga nelle cellule a cilia vibratili di animali a sangue freddo; nelle Testuggini il movimento delle cilia prosegue per alcune settimane dopo la morte, ed è arrestato solamente dai processi putrefattivi.

Se poi il tessuto si trova in un ambiente favorevole, la sua vita può protrarsi ancor di più. In frammenti di mucosa buccale di Rana, trapiantati nel sacco linfatico, i movimenti delle cilia persistono perfino dopo 5 mesi; ciascun pezzetto di mucosa si circonda di un involucro mucilaginoso, prodotto dalle cellule caliciformi del frammento trapiantato; vi si costituiscono degli isolotti epiteliali mobili colle cilia rivolte verso l'esterno e delle cisti colle cilia verso l'interno, nelle quali il liquido contenuto viene fatto ruotare continuamente (Zielensko, Schumacher).

Parimenti i muscoli striati e lisci suddivisi in piccoli pezzi restano contrattili per un periodo più o meno lungo. La muscolatura striata di insetti può venir dissociata in gruppi di poche fibre, in modo che le più minute particolarità di struttura delle singole fibre divengono visibili al microscopio; ciononostante esse si contraggono, se stimulate; il che permise appunto di studiare nella fibra vivente le modificazioni che esse subiscono durante la contrazione.

Così pure piccoli anelli o nastri di organi contenenti tessuto muscolare liscio, separati dal corpo, sottostanno a contrazioni ritmiche per lungo tempo (Stiles, Bottazzi, Langley, Magnus, ecc.). La sopravvivenza di cellule non dotate di movimenti non può essere provata altrettanto facilmente: la persistenza della loro integrità, apprezzabile all'osservazione microscopica non è un criterio sufficiente, perchè talvolta la struttura dei tessuti si mantiene integra anche dopo la morte, o per lo meno le modificazioni che segnano l'arresto della vita non sono

sempre appariscenti, e su di esse siamo troppo poco orientati perchè vi si possa fare sicuro assegnamento, per stabilire se un frammento di tessuto ha cessato o no di vivere.

Ma questa prova si può avere indirettamente, cioè innestando il frammento asportato e mantenuto per qualche tempo fuori dell'organismo, nello stesso individuo da cui fu tolto, oppure in un altro; l'attecchimento del tessuto ne dimostra la sopravvivenza.

Il risultato fu in molti casi positivo; pezzetti di cute umana conservata in soluzione fisiologica di Cloruro di sodio od in un liquido contenente sostanze organiche (liquido ascitico) attecchirono in un nuovo ospite (Wentcher, Bremer); talvolta il tessuto si palesò vitale perfino dopo tre settimane (Ljungren).

La cornea della lepre risultò collo stesso metodo vivente dopo 12 giorni di conservazione a bassa temperatura.

Il periostio di coniglio conservato anche per alcuni giorni fuori dell'organismo, quando viene riinnestato manifesta potere osteogenetico (Ollier, Donati).

Sembra che alcuni tessuti (tegumento) isolati continuino a vivere anche dopo la perdita di una rilevante quantità di acqua.

Negli esempi citati i frammenti separati dall'organismo non trovano evidentemente nell'ambiente ad essi estraneo le condizioni adatte per una lunga vita, e questa finisce coll'arrestarsi. Solamente quando vengono trapiantati in un altro individuo, la loro vita si protrae per un certo periodo; se chi li accoglie è lo stesso individuo da cui erano stati tolti, la vita del tessuto può essere definitivamente salvata, ed esso diviene parte integrante del nuovo organismo (innesto autoplastico), se invece essi sono ospitati da un altro individuo, anche se questo appartiene alla stessa specie, il tessuto innestato sembra sia sostituito dal tessuto dell'ospite, al punto che dopo qualche tempo del primo non rimane traccia veruna (innesti omoplastici ed eteroplastici) ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Solamente i tessuti embrionali si mantengono indefinitamente, e talora conservano i propri caratteri specifici di tessuto e di specie, anche in innesti omoplastici ed eteroplastici, come le splendide ricerche di Harrison, di Braus e di Spemann dimostrano. Per i tessuti dell'adulto è quasi universalmente riconosciuto, non soltanto che perdono i caratteri specifici, ma che vengono prima o poi sostituiti dai tessuti dell'ospite, anche se questo appartiene alla stessa specie.

Ma evidentemente quando un organo od una sua parte viene innestata in un altro individuo o nello stesso in cui fu tolto, la sua vita non è più autonoma, ma diviene parte integrante dell'ospite, risentendo l'influsso degli ormoni di quest'ultimo. *Cosicchè questo metodo non ha valore per la conoscenza della vita autonoma dei tessuti, ma può servire a provare la sopravvivenza del tessuto tolto dall'organismo, quando manchino altre manifestazioni di vita; ed è per questo che incidentalmente ne abbiamo fatto cenno.*

Prescindendo adunque dai tessuti trapiantati in un altro ospite, in quelli conservati fuori dell'organismo, la vita dei frammenti di tessuto è breve, e le loro manifestazioni funzionali sono limitate a singoli fenomeni; le cellule pur continuando a vivere, non sono in grado di moltiplicarsi ulteriormente, oppure se questo avviene, come nel caso degli elementi del sangue, studiati da Ranvier e da Jolly, la proliferazione cellulare non si protrae a lungo.

Con altre parole era, *fino a pochi anni or sono, riconosciuta la possibilità di una sopravvivenza di frammenti di tessuto di un organismo adulto, non di un accrescimento.*

Per gli organismi vegetali la sopravvivenza e l'accrescimento di pezzetti di tessuti isolati fu dimostrata nel 1902 da Haberlandt; cellule dissociate artificialmente di foglie di *Lamium purpureum* e di varie altre piante e conservate in liquidi nutritivi adatti, si mantengono in vita per alcune settimane, ma non si dividono. Ma se invece di isolare un tessuto nei suoi elementi, si conservano in modo opportuno dei piccoli complessi di tessuti (placchette di tuberi di patate, lamelle di foglie di varie piante) essi si accrescono, anche se privi di fasci vascolari, purchè uniti ad altri pezzetti che ne possiedono.

L'impulso alle divisioni cellulari sarebbe determinato dalle sostanze nutritive addotte dai fasci vascolari, oltre che dallo stimolo della ferita prodotta nella preparazione del pezzo.

A Leo Loeb risalgono i primi tentativi, iniziati nel 1898, nella ricerca di un metodo, che permettesse l'accrescimento di frammenti di tessuto animale isolati dall'organismo; egli trasportò pezzetti di tegumento in tubi contenenti coaguli di sangue, di linfa o di siero di sangue coagulato.

I tessuti dopo qualche tempo venivano conservati e suddivisi in sezioni microscopiche ed esaminati.

Fu constatato, che una gran parte del tessuto si necrotizza, verisimilmente per l' assenza di Ossigeno; infatti, facendo passare una corrente di Ossigeno in un tubo di coltura contenente pezzetti di carcinoma di topo e di rene di coniglio, la parte periferica del frammento apparve cresciuta in estensione e le sue cellule erano in attiva divisione cariocinetica.

Questi tentativi di Leo Loeb non ebbero seguito; l' impossibilità di rendersi conto dello svolgimento dell' accrescimento del tessuto, finchè questo si manteneva in vita, giustificava lo scetticismo con cui essi furono accolti.

Un immenso, impreveduto progresso nella conoscenza della vita autonoma dei tessuti isolati dell' organismo, si ebbe col metodo scoperto da Harrison e svolto ulteriormente da Burrows e da Carrel, che oggi viene denominato metodo della coltivazione dei tessuti in vitro.

Nel metodo di Harrison non vi è nulla di sostanzialmente nuovo, bensì rappresenta una felice associazione di tecniche conosciute; il materiale fu quello adoperato nelle esperienze di Born poco fa riferite (pag. 13); ma anzichè lasciare i frammenti di embrioni di Rana nell' acqua, come faceva Born, essi furono racchiusi in un mezzo adatto, in un coagulo, come Jolly e Delytzen avevano fatto per il sangue, Leo Loeb per i tessuti. Il coagulo fu ottenuto raccogliendo qualche goccia di linfa dal sacco linfatico della Rana; in tutto il procedimento furono seguite le norme adatte ad evitare l' inquinamento dei germi.

Ed affinchè l' esame microscopico del preparato vivente fosse possibile, il pezzetto di larva veniva posto sopra una sottile lastrina di vetro e bagnato con linfa; quando questa era coagulata, la lastrina veniva capovolta e sovrapposta ad una cella di vetro, come per le osservazioni sui protozoi e batteri in goccia pendente; il preparato veniva circondato con un orlo di paraffina, per impedire ad un tempo l' evaporazione e l' inquinamento con germi.

Burrows ⁽¹⁾ adoperò come terreno di coltura il plasma

(¹) Burrows lavorò nel laboratorio di Harrison nella Yale University, cosicchè a questo grande embriologo risale il vanto, oltre che di aver

sanguigno di pollo, ottenuto dal sangue colla centrifugazione, e coltivò per il primo tessuti di embrioni di animali a sangue caldo (pollo).

La portata del metodo di Harrison, reso noto sin dal 1907, non fu dapprima compresa, all'infuori della ristretta cerchia dei cultori di embriologia sperimentale, finchè Carrel nel 1910 non divulgò in Germania i risultati da lui ottenuti col nuovo metodo.

E' inutile che ci fermiamo sulle critiche che suscitarono nel mondo scientifico i primi risultati sulla coltivazione dei tessuti, perchè ormai tutto ciò appartiene al passato; è la sorte comune a tutte le scoperte più belle e più originali, di suscitare l'ostilità degli ignavi, che temono lo splendore dei fatti nuovi. Si pretese, che la denominazione, oggi da tutti accettata, di « coltura » per l'accrescimento dei tessuti fuori dell'organismo non fosse appropriata, (Jolly, Dilger, Oppel ed altri), perchè i medesimi non si accrescevano, ma tutt'al più sopravvivevano; secondo Jolly le divisioni cellulari incominciate durante la vita dell'animale da cui il tessuto proviene, terminano, ma non se ne producono di nuove.

Ma oggi noi sappiamo che questa critica è infondata; chiunque ha studiato delle culture viventi attive ha visto in una stessa cultura divisioni cellulari a centinaia, che si susseguono ininterrottamente in un breve periodo di tempo; cosicchè ognuno può convincersi che nelle medesime, le mitosi si succedono con un ritmo incomparabilmente più veloce, che nell'organismo al quale il tessuto appartiene. Dimodochè l'analogia fra il comportamento delle cellule in queste condizioni e quello degli organismi unicellulari, che si sviluppano in un mezzo naturale ed artificiale, adatto al loro rigoglioso accrescimento, analogia che ha suggerito il nome di « coltura », è veramente grandissima.

scoperto il metodo, e di averne ispirato i perfezionamenti, che permisero di estendere grandemente questo campo di ricerche.

Perciò è doppiamente ingiusto di attribuire a Carrel, come si fa generalmente, la scoperta del metodo delle colture in vitro. Con ciò non intendiamo di diminuire i grandissimi meriti che Carrel si è acquistato in questo campo di indagini. Ma non è giusto che gli si attribuisca, come si fa generalmente, la scoperta del metodo delle colture, che spetta solamente a Harrison.

Oppel propone per questo procedimento la denominazione di « espiantazione », destinata ad accentuare il contrasto fra lo sviluppo di un tessuto isolato e quello di un tessuto trapiantato in un altro individuo e chiama « Explantat » (in italiano « espianto ») il frammento d'organo che viene coltivato.

Champy vorrebbe limitare la denominazione di coltura a quei casi, nei quali vi è una rigogliosa proliferazione di cellule; mentre quando le cellule allevate fuori dell'organismo anzichè moltiplicarsi si differenziano — come nel caso dei neuroblasti — si tratterebbe di sopravvivenza.

Questa distinzione mi sembra poco opportuna; l'attività proliferativa dei tessuti allevati fuori dell'organismo può esser assai diversa a seconda della natura del tessuto; grandissima per le cellule mesenchimali, molto minore per le altre; ma anche le prime possono moltiplicarsi più o meno attivamente a seconda della proprietà del mezzo e di altre condizioni; cosicchè una distinzione sostanziale fra i tessuti che proliferano rigogliosamente, e quelli nei quali si conservano i caratteri specifici ed i fatti di moltiplicazione sono meno attivi, non è possibile.

In breve noi concediamo, che la denominazione di « coltura » ha un valore empirico, ed è priva di contenuto scientifico; fu adottata, lo ripetiamo, per il desiderio di accentuare l'analogia fra il comportamento degli organismi unicellulari e quello delle cellule dei Metazoi nei mezzi nutritivi, e riteniamo utile mantenerla, perchè si presta ad indicare succintamente la persistenza in frammenti di tessuto isolati di qualsiasi manifestazione vitale; è ovvio che queste saranno differenti nei vari tipi di tessuto e per condizioni intrinseche: riproduzione cellulare, nelle colture di mesenchima; differenziazione di neuriti da neuroblasti, in quelle di tessuto nervoso: pulsazioni ritmiche nelle colture di tessuto muscolare.

Quasi tutti i tessuti embrionali ed adulti di Vertebrati, come pure i tessuti neoplastici sono suscettibili di esser coltivati; sugli Invertebrati l'esperienza che abbiamo è limitata a poche specie; in genere i tessuti di animali in accrescimento si coltivano più rigogliosamente di quelli adulti.

In quanto al terreno di coltura, dapprima sembrava, che condizione essenziale per la riuscita fosse, che le cellule trovas-

sero nel mezzo di coltura uno stroma dotato di una certa consistenza, il quale permettesse loro di emigrare dal frammento di tessuto nell'ambiente che lo circonda, e di moltiplicarvisi.

A questa condizione rispondono molto meglio dei mezzi solidi artificiali (Agar in liquido di Ringer), nei quali pure fu notato un certo grado di accrescimento, i coaguli ottenuti da liquidi dell'organismo; plasma sanguigno e linfa, in cui il reticolo di fibrina costituisce l'impalcatura di sostegno alle cellule. Successivamente da Harrison fu dimostrato, che le cellule possono emigrare dal frammento di tessuto, anche se il terreno di coltura è liquido, purchè in quest'ultimo sia disteso un delicato reticolo, il quale serva di sostegno alle cellule; ad esempio una tela di ragno.

I due biologi americani W. ed M. Lewis hanno ottenuti buoni risultati con mezzi di coltura liquidi (di Locke con aggiunta di brodo di pollo, siero di sangue ecc.) anche senza la presenza di corpi solidi, se il liquido è disteso in uno strato sottile, perchè le cellule scorrono aderendo alla faccia del vetrino, fra questo ed il velo liquido.

Però il plasma ha di fronte agli altri terreni nutritivi la superiorità di contenere le sostanze nutritive più adatte alla vita delle cellule. Ed infatti le colture in plasma son più rigogliose di quelle eseguite con altri mezzi.

Il plasma dovrà essere a preferenza omospecifico, cioè proveniente da un animale appartenente alla stessa specie, alla quale il tessuto coltivato appartiene; ed anzi l'« optimum » di attività si avrebbe quando il plasma è autogeno, cioè proviene dallo stesso individuo da cui fu tolto il tessuto da coltivare.

Però anche in plasma eterospecifico, cioè appartenente ad altra specie, la coltivazione è possibile, per quanto più limitata; ad es. tessuti di embrioni di pollo crescono in plasma di coniglio, ma meno rigogliosamente che in plasma di pollo.

Durante un breve periodo il tessuto cresce anche in plasma eterospecifico, ma ben tosto la proliferazione cellulare si arresta. In che consista quest'azione inibitrice esercitata sull'accrescimento del tessuto, è poco chiaro.

Champy e Coca paragonano l'azione del plasma eterospecifico, che rapidamente uccide le cellule della coltura, alla

azione emolitica esercitata dai sieri sui globuli rossi; esso sarebbe dannoso al tessuto, più che per la mancanza del materiale nutritivo, per le tossine che esso contiene.

Questa supposizione è convincente, ma alcuni fatti sembrano contraddirla.

Riesce incomprensibile, come i tessuti di alcuni animali crescano benissimo in plasmi di specie appartenenti ad altre classi di Vertebrati; ad es. il tessuto di ratto cresce benissimo in plasma di testuggine; invece tessuti di piccione non crescono affatto in plasma di gatto (Champy e Coca).

Un'altra condizione indispensabile per la riuscita della coltura è l'assenza di germi, e perciò il procedimento deve essere eseguito secondo le norme dell'asepsi più scrupolosa; in singoli casi si può avere accrescimento anche in presenza di germi, per circa 36 ore, ma non più oltre.

RIASSUNTO

Cellule dei Metazoi viventi liberamente in un liquido ed anche gruppi di cellule dei tessuti separati dall'organismo possono sopravvivere se si trovano in ambiente adatto: in un liquido organico od in una soluzione isotonica di elettroliti: ma non si accrescono. Se invece un frammento di tessuto viene conservato, seguendo modalità tecniche opportune, (cioè se è molto piccolo e se fu esciso in modo da non produrvi lesioni), in un mezzo privo di germi, purchè questo contenga i materiali nutritivi necessari al tessuto, e purchè le cellule che emigrano dal tessuto trovino un sostegno dotato di una certa consistenza, questo frammento di tessuto si accresce molto più rapidamente che nell'organismo al quale esso appartiene; si ottiene cioè quella che vien chiamata una coltura di tessuti.

CAP. III.

La tecnica della coltivazione dei tessuti “ in vitro ” - Come si svolge la migrazione e l'accrescimento delle cellule in una coltura.

E' convinzione diffusa fra i cultori di Biologia, che la coltivazione dei tessuti in vitro esiga una tecnica complessa. Invece queste ricerche possono essere compiute in qualsiasi Laboratorio, anche se dotato di modesti mezzi.

Il procedimento che può talora presentare qualche difficoltà è la preparazione del plasma sanguigno, che dovrà essere eseguita in modo che questo si conservi liquido per qualche tempo; perciò deve essere evitato, al momento dell'estrazione del sangue dall'animale, il contatto coi tessuti, ed il sangue verrà immediatamente raffreddato; inoltre i tubetti di vetro destinati ad accogliere il sangue saranno, anche durante la centrifugazione, circondati di ghiaccio.

Il sangue verrà raccolto dall'animale introducendo in un vaso una cannula di vetro unta di un sottile strato d'olio d'oliva.

Nell'estrarre il sangue direttamente dal cuore, è più difficile di evitare la contaminazione coi tessuti; quest'è possibile coll'introdurre nel ventricolo destro una pipetta con estremità aguzza tagliata a becco di flauto. Convieni rinunciare alle prime ed alle ultime gocce di sangue; così si è sicuri che il plasma raccolto non contiene il liquido dei tessuti, il quale, com'è noto, ne determina la coagulazione.

Il sangue dei Mammiferi coagula più facilmente di quello di pollo, e perciò la preparazione del plasma liquido è in questi animali più difficile, specialmente se si tratta di specie piccole; per queste si consiglia di afferrare il moncone del

vaso con una pinza, e di dirigere il getto di sangue verso il tubetto che deve accoglierlo; così si evita che il sangue sia contaminato dai tessuti.

Si centrifugano i tubetti di vetro contenenti il sangue e circondati di ghiaccio per 5 minuti; poi il plasma privo di elementi morfologici viene trasportato con una pipetta in altri tubi di vetro paraffinati e raffreddati.

Il materiale con cui più facilmente si ottengono buone colture è quello di embrioni di pollo dal 2° giorno in poi; anche tessuti di pulcini inoltrati si prestano ottimamente.

Frammenti di cuore, di tegumento, di milza, di intestino di embrioni inoltrati danno con facilità colture attive di elementi mesenchimali.

Colture di epitelio si avranno agevolmente dal tegumento, dall'intestino, dall'amnios, dal pericardio, ecc.; di cellule muscolari lisce dall'amnios; di elementi muscolari striati dal cuore di embrione di Rana, oppure di embrione di pollo dal 3° al 10° giorno d'incubazione.

Anche tessuti fetali ed adulti di Mammiferi, come pure tessuti neoplastici di topo possono essere coltivati.

L'accrescimento dei tessuti umani invece si arresta presto, perchè il coagulo fluidifica; fra i pochi tentativi riusciti discretamente ricorderemo quelli di Maccabruni, di coltura di ovaio e di utero di feto umano.

L'embrione o l'organo da coltivare viene subito ⁽¹⁾ immerso in liquido di Locke sterile riscaldato alla temperatura di 39° e con forbicine ben affilate o con un coltellino si escidono dei frammenti di 1-1,5 mm. di diametro, evitando di comprimerli o di dilacerarli, e questi saranno trasportati sopra un vetrino coprioggetti (fig. 1, *v*); si aggiunge una piccola goccia di plasma, si capovolge il vetrino, sopra un portaoggetti ad incavo (fig. 1, *p*), si circonda con paraffina e si trasporta in un termostato a 39°. Se si tratta di un animale a sangue freddo, la coltura sarà naturalmente tenuta alla temperatura dell'ambiente.

Il destino degli elementi coltivati in vitro viventi potrà

(¹) Però la coltivazione riesce anche con organi conservati per qualche giorno in ghiacciaia. Vedi anche pag. 9.

essere seguito sotto il microscopio, riscaldato alla temperatura di 39° in un apposito termostato.

Se il tessuto è immerso in una grossa goccia di plasma, le cellule che si affollano nel coagulo si sovrappongono in parecchi strati, e l'osservazione microscopica della coltura vivente con forti ingrandimenti non è possibile; questo invece non avviene se il coagulo è sottile, e l'esame microscopico della coltura può essere compiuto anche con obbiettivi ad immersione. Nelle colture di embrioni di pollo sovente, già dopo poche ore, si manifestano segni di attività; singoli elementi incominciano ad apparire lungo il contorno del frammento ed emigrano dal plasma.

Dopo 24-36 ore un largo alone di cellule invade il coagulo. Allora, il tessuto neoformato è distintamente visibile ad occhio nudo; appare come un'aureola, che è opaca in immediata vicinanza del frammento, va diventando gradatamente più trasparente verso la periferia.

Una coltura lasciata a sè di rado vive per più di 5-6 giorni. Ma è possibile di prolungarne la vita col metodo di Carrel del rinnovamento.

Partendo dal principio, che i prodotti del catabolismo, che si vanno accumulando, sono dannosi alle cellule, e che le sostanze nutritive del plasma si esauriscono, Carrel consigliò di lavare la coltura e di aggiungervi del plasma fresco.

Tolta la paraffina che circonda il coprioggetti, il coagulo viene sollevato con un coltellino, viene lavato in liquido di Ringer, suddiviso in 3-4 frammenti, coi quali si allestiscono nuove colture in plasma fresco.

In ciascuno dei nuovi preparati l'attività delle cellule provenienti dall'antica coltura si ridesta; si ottiene una nuova spinta all'accrescimento, che dura per 4-5 giorni; ed anche se il procedimento viene ripetuto molte volte, la tendenza a crescere da parte delle cellule non accenna ad esaurirsi mai.

Anche col metodo di Burrows, di sottoporre la coltura ad un perenne lavaggio con siero di sangue o con altri liquidi, si prolunga la vita della coltura, sebbene non per un periodo altrettanto lungo che col rinnovamento ripetuto, e si favorisce una più perfetta estrinsecazione di alcune manifestazioni funzionali delle cellule coltivate. Il liquido di lavaggio è portato

alla coltura da un piccolo recipiente, mediante un filo di cotone contenuto in un tubo di vetro; l'altra estremità del filo arriva ad un altro recipiente destinato ad accogliere il liquido che ha attraversato il tessuto; ed affinchè quest'ultimo possa imbevversarsi di liquido, occorre che i filuzzi di cotone restino impiagliati nel coagulo di plasma. Naturalmente tutto è disposto in modo da assicurare l'asepsi più rigorosa.

L'apparecchio sarà collocato sul tavolino del microscopio, e mantenuto a temperatura costante nel termostato.

Le colture possono anche venir conservate definitivamente; e per far questo esse saranno sottoposte ai procedimenti abituali nella tecnica istologica; il coprioggetti viene liberato dalla paraffina che lo circonda ed immerso per pochi minuti nel liquido fissatore, poi colorato e montato, come se si trattasse di uno striscio di sangue.

La coltura può venir anche suddivisa in sottili sezioni, il che riescirà utile specialmente quando si abbia di mira lo studio dei fenomeni che si svolgono nell'interno del frammento; in tal caso, dopo aver lasciato per qualche minuto nel liquido fissatore il vetrino al quale la coltura aderisce, il coagulo nel quale il pezzetto è contenuto verrà distaccato cogli aghi, conservato per qualche tempo ancora nel fissatore, poi disidratato, incluso in paraffina e sezionato al microtomo.

La tecnica fin qui descritta è quella che viene comunemente seguita per piccole colture; e queste corrispondono perfettamente per osservazioni di morfologia e di biologia cellulare. Se invece ricorriamo al metodo della coltivazione « in vitro » per ricerche sull'immunità, si richiedono colture più estese. Carrel per questo scopo si serve di speciali scatole di vetro che sono in uso nella tecnica batteriologica (di Gabritschewski) e prepara i frammenti di tessuto sopra un velo di seta teso sopra un telaio; il tessuto neoformato si estende sul velo di seta. Da un intero embrione di pollo al 15° giorno, suddiviso in molti pezzetti dello spessore di una testa di spillo, Carrel ha con questa tecnica ottenuto un'unica coltura.

Rivolgendoci a considerare i caratteri microscopici delle colture viventi, rileveremo subito che, sebbene questi siano diversi anche in colture dello stesso tessuto ed eseguite nelle identiche condizioni, il fenomeno a tutte comune è l'affac-

ciarsi lungo il margine del frammento di organo esciso dall'animale che chiamiamo « espianto » (pag. 19) di cellule o di fibre che si spingono nel coagulo e lo abitano per un estensione progressivamente crescente.

Cosicchè in una coltura debbono essere distinte due parti dotate di caratteri strutturali e biologici diversi: l'espianto, cioè il frammento di tessuto esciso, destinato quasi sempre a regredire rapidamente, e che per lo più per il suo spessore e la sua opacità non è accessibile all'esame microscopico; e gli elementi (cellule e fibre) provenienti dal primo, contenuti nel coagulo e che possono, perchè distesi in una sottile lamina trasparente, essere studiati al microscopio nei loro caratteri strutturali e biologici; è una vera e propria isolazione spontanea degli elementi costitutivi del tessuto che si ottiene con questo mezzo.

Considerando le cose da un punto di vista generale, gli elementi che divengono visibili al microscopio, provengono in parte da migrazione di cellule, che facevano parte integrante del tessuto e se ne sono liberate, in parte da moltiplicazione di elementi del tessuto stesso.

Può accadere, che la moltiplicazione cellulare vada in seconda linea, di fronte alla migrazione. Nella coltivazione di tessuto nervoso si hanno condizioni particolari; gli elementi costitutivi, i neuroblasti, non cambiano di sede, ma per attività ameboide del protoplasma spingono nel coagulo prolungamenti sottili e lunghi, destinati a divenire vere e proprie fibre nervose.

La diversità nei caratteri morfologici degli elementi dipendono in parte dalla natura dell'organo coltivato, e sino ad un certo punto anche dallo stadio di sviluppo dell'embrione, ma soprattutto da condizioni estrinseche, e fra queste hanno massima importanza le proprietà del mezzo. La forma delle cellule può cambiare, ad es. per diluizione del plasma ed anche per altri fattori sconosciuti, visto che anche seguendo l'identica tecnica può prevalere l'uno e l'altro tipo cellulare.

Ad esempio da frammenti di miocardio di embrioni di pollo all'8-10° giorno emigrano nel plasma, a vicenda, cellule mesenchimali, oppure elementi muscolari ed infine elementi dell'uno o dell'altro tipo.

Per dare al lettore un'idea dei fenomeni essenziali che si svolgono a partire dal momento in cui il tessuto è stato espianato nella cella di vetro, illustreremo la migrazione degli elementi del mesenchima, la quale rappresenta l'eventualità più comune in tutti i tessuti.

La migrazione delle cellule si inizia più precocemente di quanto si potrebbe supporre; di solito dopo 6-7 ore, ma in colture in plasma diluito molto prima, perfino dopo 1-2 ore; altre volte con grande ritardo, anche dopo 24 ore.

Il primo segno di attività della coltura è indicato dalla comparsa in singoli tratti del margine dell'espianto di qualche filuzzo esile e pallido; il loro numero aumenta rapidamente, cosicchè costituiscono ben tosto un fittissimo intreccio.

Le propaggini crescono in lunghezza ed emettono appendici collaterali, pure esili, che vengono tosto retratte e poi di nuovo emesse.

Ben presto esse si ispessiscono, ed infine ciascuna trascina dietro di sé la parte nucleata del corpo cellulare; si ha l'impressione che le cellule siano attratte dal tessuto nel plasma.

La parte centrale del corpo cellulare, che circonda il nucleo, è preceduta da un esile propaggine, la quale prende inserzione sovra un filamento di fibrina, e che può in questo modo esercitare efficacemente una trazione sul restante della cellula.

Gli elementi che prima degli altri appaiono nel coagulo provengono verisimilmente dalla parte periferica del frammento, ed appartengono alla trama del tessuto di sostegno; essi emigrano nel plasma per attività protoplasmatica, paragonabile a quella con cui si compie la locomozione delle amebe e dei leucociti, ma che si svolge con caratteri diversi che in quegli elementi; il primo segno di tale attività è appunto rappresentato dall'emissione di quelle sottili propaggini.

Mentre nelle prime ore i movimenti protoplasmatici che conducono alla migrazione delle cellule sono lenti, non appena queste sono arrivate nel plasma, la migrazione diviene veloce, e dopo 24 ore molti elementi hanno percorso talora un cammino relativamente lungo; ed in un periodo di tempo così breve le cellule emigrate son già in buon numero. Naturalmente più tardi ad esse se ne aggiungono delle altre.

Le cellule dei tessuti hanno la proprietà di emigrare emettendo propaggini solamente in periodi precoci dello sviluppo, la perdono non appena il tessuto comincia a differenziarsi; invece nelle colture questa proprietà riappare, anche se il tessuto espantato proviene da un animale adulto o da un embrione inoltrato.

Prima di approfondire l'analisi dei caratteri di questi elementi, vediamo di renderci ragione del destino spettante all'espianto dal quale provengono.

Il medesimo per il suo spessore e per la sua opacità non è suscettibile di essere esaminato al microscopio finchè è vivente (pag. 26), bensì occorre conservare la coltura coi metodi in uso nella tecnica istologica (pag. 25).

Champy ha dimostrato per questa via, che la parte centrale dell'espianto degenera per autolisi sin dalle prime ore, e ritiene che ciò dipenda in parte da asfissia, in parte da assenza di nutrimento; ma che il secondo fattore sia accessorio per la vitalità del tessuto, è provato dal fatto, che essa varia molto a seconda della natura del tessuto e dello stadio di sviluppo; se il tessuto proviene da embrioni precoci e se il frammento è sottile, l'autolisi può avvenire in esso in misura limitatissima, almeno nei primi giorni.

Inoltre la coltivazione è possibile anche in mezzi liquidi inorganici, come le ricerche di W. e M. Lewis hanno provato (pag. 20); in tal caso la nutrizione delle cellule emigrate avverrebbe a spese dei prodotti di disintegrazione degli elementi caduti in preda all'autolisi, il che prova, che il diretto contatto col plasma non è condizione indispensabile per la vita del tessuto.

La rapida morte delle cellule della parte centrale dell'espianto dipende dalla distanza relativamente grande che separa quest'ultima dalla camera d'aria della cella, dimodochè esse non possono trarne Ossigeno in quantità sufficiente, ed anche dall'accumulo in uno spazio ristretto di un eccesso di prodotti di rifiuto (fig. 1, *d*). Ma, lo ripetiamo, i tessuti di embrioni precoci resistono più a lungo agli agenti nocivi sopra indicati, di quelli più differenziati e di adulti; fatto del resto ben conosciuto.

Le parte periferica dell'espianto (fig. 1, *f*) sopravvive

invece più a lungo del nucleo centrale, perchè è in più diretto contatto coll' Ossigeno della camera d' aria e perchè essendo imbevuta di plasma, vi si stabiliscono delle correnti di diffusione, le quali allontanano, almeno in parte, i prodotti catabolici, ed anzi la medesima (zona fertile, secondo Champy) è la matrice della vera e propria coltura; essa è il punto di partenza delle cellule che muovono verso il coagulo, ove co-

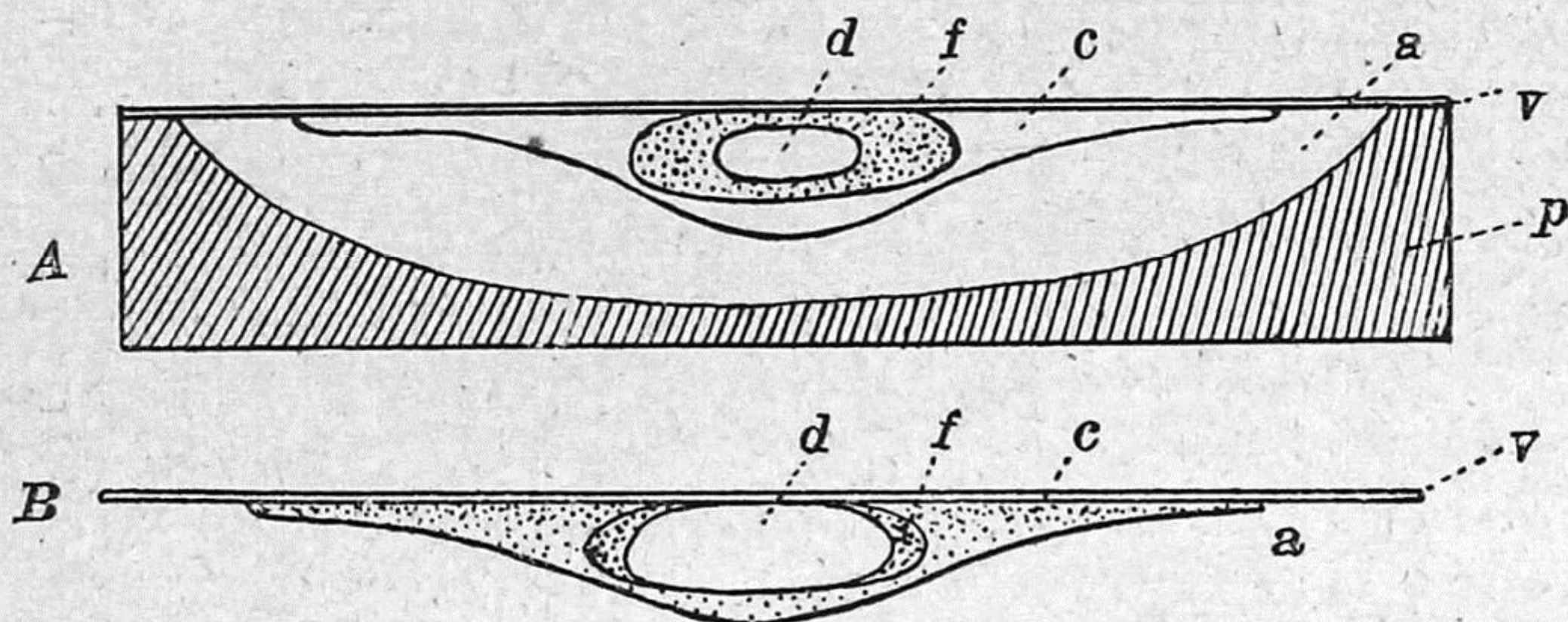


FIG. 1 - Sezioni schematiche di una coltura in una cella di vetro (imitata da Champy), ingrandita circa 20 volte: *A*, poche ore dopo l'espianto; *B*, dopo qualche giorno di vita della coltura; *p*, porta-oggetto ad incavo; *v*, vetrino coprioggetto; *a*, camera d'aria; *d*, parte in degenerazione dell'espianto, meno estesa in *A* che in *B*; *f*, zona fertile dell'espianto più estesa in *A* che in *B*; *c*, coagulo di plasma che in *B*, cioè dopo qualche giorno è occupato da cellule emigrate dalla zona fertile (zona d' invasione).

stituiscono la zona d' invasione (Champy); la moltiplicazione cellulare avviene tanto nell' una che nell' altra, ma è forse più attiva nella prima.

Cosicchè la zona d' invasione (fig. 1, *c*) è in parte costituita da cellule provenienti direttamente dall'espianto e che si sono da esso allontanate, in grazia alla vivace attività che hanno acquistato per adattamento al nuovo ambiente, in parte sono cellule della zona fertile riprodottesesi per mitosi, e che perciò si originano meno direttamente dal tessuto originario; altre infine sono sorte in sito nella zona d' invasione per divisione mitotica delle sue cellule.

La parte dell' espianto in regressione si estende rapidamente a spese della zona fertile (fig. 1, *d* in *A* e *B*); già in colture di 8-10 ore Champy trovò quest' ultima molto ridotta; e la parte in autolisi può comprendere, oltre il vecchio espianto,

anche del tessuto nuovo, che ha germogliato nelle prime ore per regredire più tardi.

Quanto sopravvive l'espianto? Certo molto più di quanto risulti dalle osservazioni di Champy, e più di quel che sarebbe prevedibile: si tenga presente, che l'assenza di attività da parte delle cellule non prova che la sua vita si sia spenta; infatti io ho notato, che se un espianto di una coltura, la quale durante i primi due giorni di vita non dava quasi segni di accrescimento, viene lavato in liquido di Ringer, ritagliato e portato in plasma fresco, la sua attività si ridesta, e gli espianti provenienti dal frammento originario appaiono circondati da larghi aloni di cellule; e nell'espianto stesso si apprezza l'esistenza di moltissime cellule integre. Cosicchè un mutamento di ambiente può ridestare l'attività sopita dei suoi elementi costitutivi.

Nelle colture di tessuti di embrioni precoci, i quali, come ho detto, sono resistentissimi all'autolisi, tutto il frammento o quasi si può considerare come fertile. Ciò appare quando accada accidentalmente di isolare dal tessuto dei frammenti costituiti da poche decine di cellule; allora queste entrano tutte in attività e si sparpagliano nel plasma; rimane solamente qualche detrito, proveniente probabilmente dalle cellule mutilate durante la preparazione, e perciò regredite. Ma anche se vengono coltivati frammenti più estesi, ma sottili, di embrioni precoci, per i movimenti attivi delle cellule e per assunzione d'acqua da parte del tessuto, si può avere una vera e propria dissociazione spontanea degli elementi costitutivi del tessuto; e le cellule dell'espianto essendo in contatto immediato colle sostanze nutritive e coll'Ossigeno, sopravvivono. Inoltre per effetto dei loro movimenti attivi, esse scivolano l'una sull'altra, ma restano unite fra loro per lunghi prolungamenti; così gli elementi costitutivi del tessuto prima di emigrare nel plasma si allontanano, e l'espianto finisce col trasformarsi in una tenue membrana (fig. 2).

In queste colture, al limite fra il tessuto e la zona d'invasione (fig. 2, *z*) vi è sovente un orlo costituito da cellule fittamente addensate e da detriti (fig. 2, *y*), ed orientate parallelamente al contorno del primo. Sembra che le cellule del tessuto si raccolgano in questa regione soffermandovisi qualche

tempo, finchè quelle contigue, emigrate in precedenza, si sono allontanate, e le prime trovano spazio sufficiente per penetrare nel coagulo.

La densità delle cellule e la speciale orientazione dipendono dalla compressione esercitata dagli elementi contigui dell'espianto, che mirano pur essi a spingersi nel coagulo.

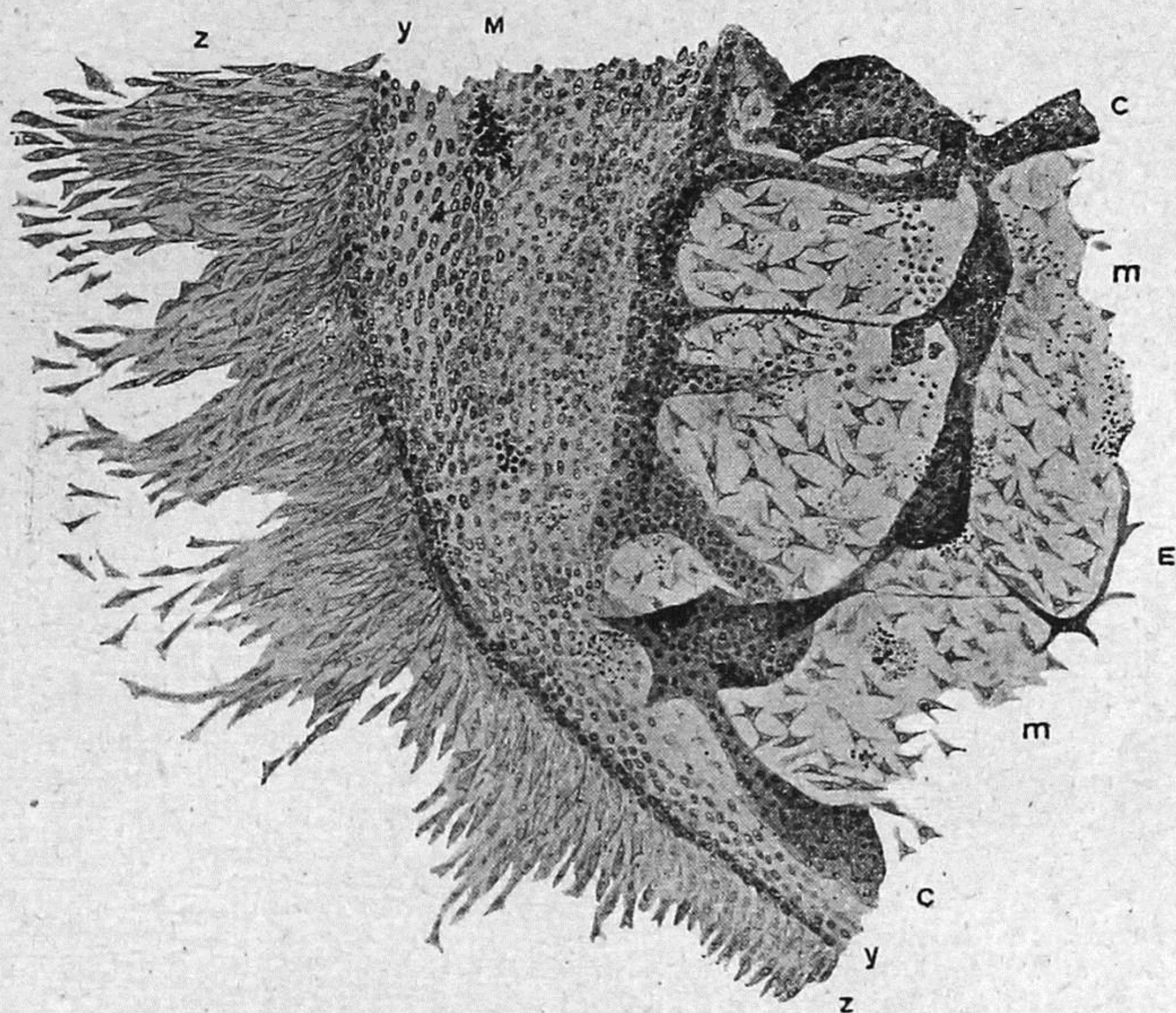


FIG. 2 - Da una coltura di embrione di pollo al principio del 4° giorno, conservata dopo due giorni di vita; l'espianto è sopravvissuto quasi in totalità: gli elementi mesenchimali *m* si sono dissociati: risaltano i cordoni epiteliali *C* provenienti dai canalicoli del mesonefros. *M*, massa di mioblasti del miotomo; *y*, strato di elementi addensati al limite fra tessuto e coagulo, a forma affusata, orientati perpendicolarmente agli elementi della zona d'invasione *Z* ancora poco estesa (Ingr. 70 circa [da LEVI]).

Dopo che il primo ordine di cellule si è allontanato, quelle retrostanti del tessuto vanno a sostituirle, dimodochè la striscia di cellule addensate non scompare mai; manca nelle colture a grosso coagulo, ove le cellule trovano maggior spazio libero davanti a sè, e possono subito invadere il plasma, senza soffermarsi al limite fra quest'ultimo e l'espianto.

ZONA D' INVASIONE. - Sappiamo che essa è costituita dalle cellule, le quali dall' espianto si sono spinte nel coagulo e vi si moltiplicano (figure 2, *z*, e 3).

La sua estensione deve adunque variare immensamente a seconda dell' età della coltura e del grado di attività di questa.

La migrazione incomincia dalle prime ore e continua per lo più sino al 3° giorno, talora sino al 4°-5°. Le singole colture

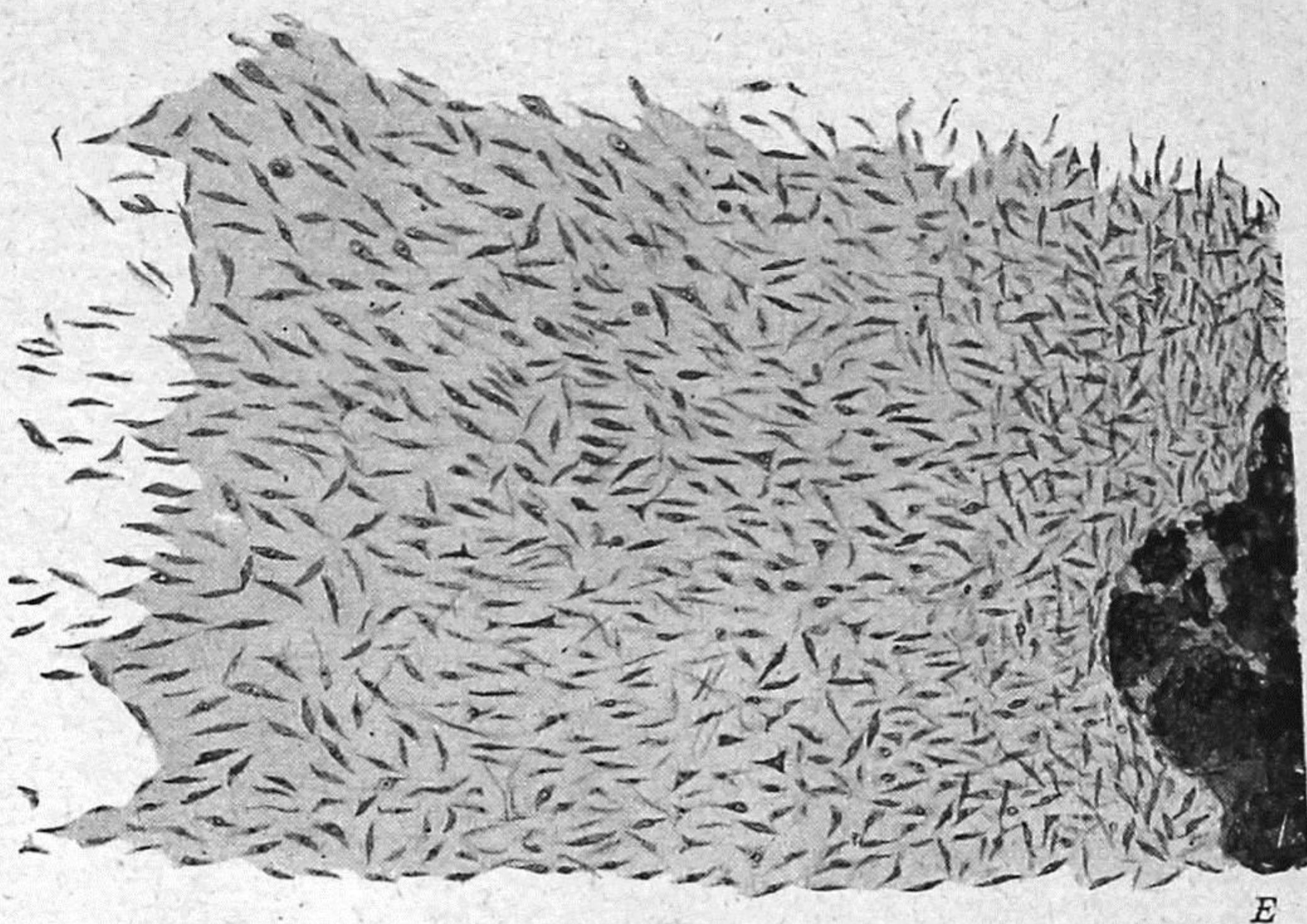


FIG. 3 - Espianto *E*, e zona d' invasione occupata da numerosi fibroblasti affusati e stellati, più fitti presso l' espianto, più radi distalmente, in una coltura di cuore di un pulcino al 10° giorno, conservata dopo 3 giorni di vita. Ingr. 70 circa (da un preparato di LEVI).

differiscono talmente l' una dall' altra, che è impossibile di riferire dei dati di fatto sul numero delle cellule migrate e sulla durata della loro vita nella zona d' invasione.

Il numero delle cellule di quest' ultima, il quale è indice del grado di attività di una coltura, dipende da due fattori, l' uno e l' altro variabilissimi; la quantità di cellule emigrate e la velocità delle loro divisioni.

Talora l' attività della coltura è limitata alle prime 24-36 ore, e solamente a regioni circoscritte dell' espianto; in tali colture le cellule emigrate nella zona d' invasione sono scarse ed esse non accennano affatto a moltiplicarsi. Alla fine del 2° giorno ogni segno di attività si spegne in queste colture.

Lo scarso successo della coltivazione può dipendere da tante cause; ma i fattori che più sovente compromettono il risultato

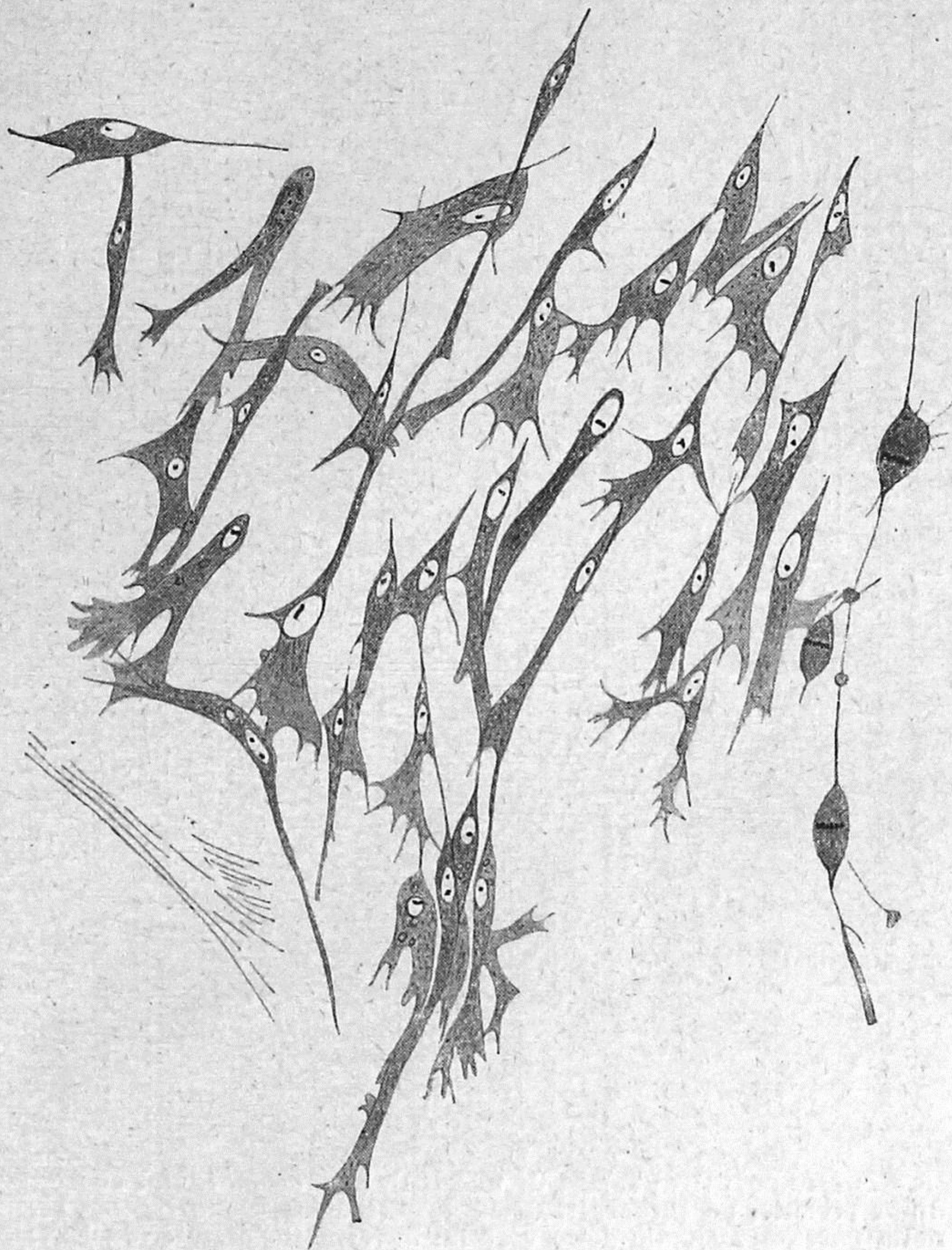


FIG. 4 - Dalla zona d'invasione di una coltura di cuore di embrione di pollo al 5° giorno, conservata al principio del 3° giorno; cellule lamellari con prolungamenti ramificati diretti verso la periferia della coltura. A destra 3 cellule in mitosi. Ingr. circa 280 (da LEVI).

dell' esperimento sono l' inquinamento con germi, e la produzione di lesioni estese nel tessuto espantato, nel momento in cui venne esciso, oppure nel trasportarlo sul vetrino. Quando in-

vece la coltura è ben riuscita, le cellule emigrate nella zona d'invasione sono straordinariamente numerose (fig. 3, 15-17). In prossimità dell'espianto, ove il coagulo è più spesso, le cel-

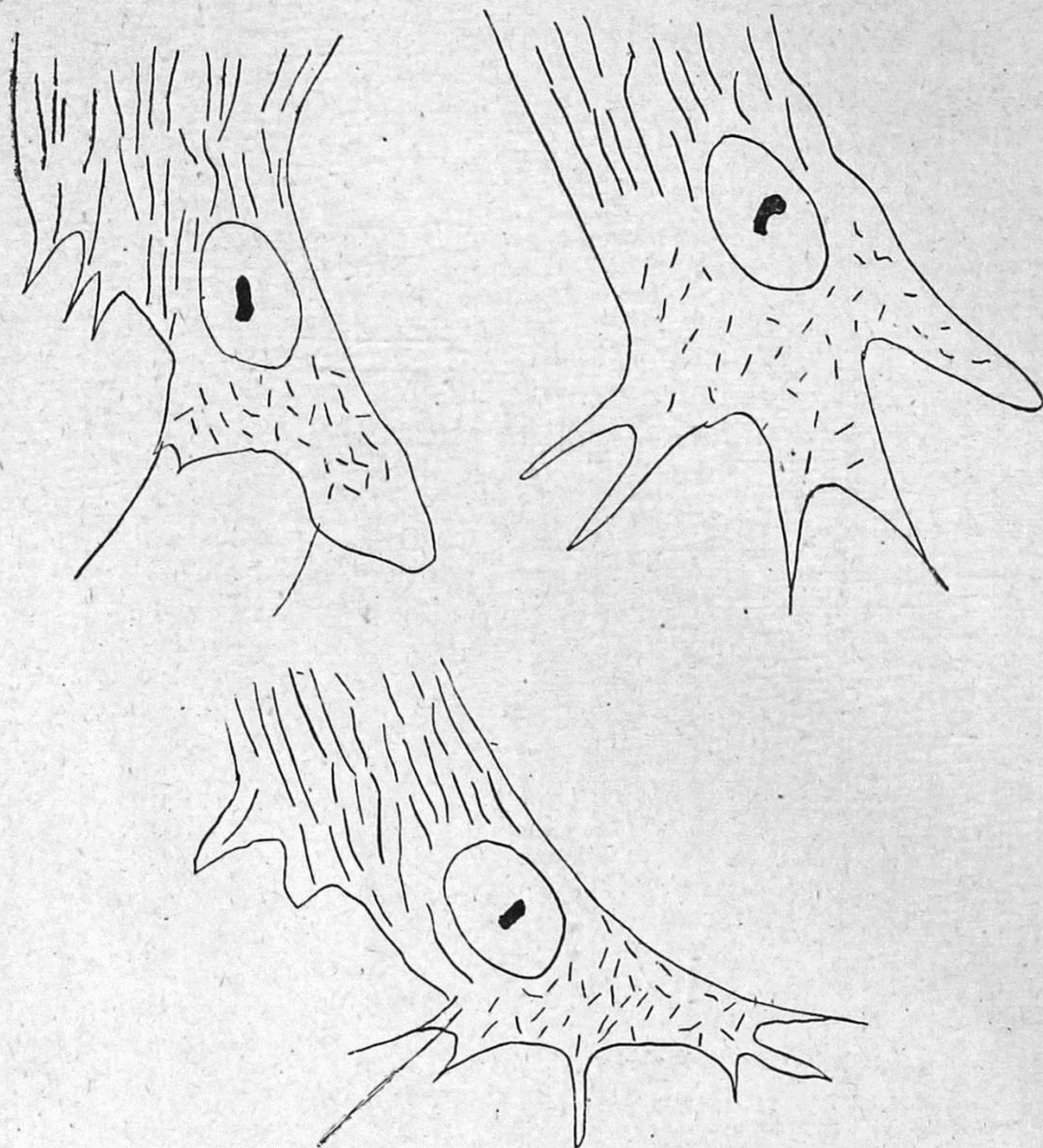


Fig. 5 - 7° Mutamenti di forma di una cellula muscolare del cuore, studiata vivente, ad intervalli di 40 minuti circa. Condrioconti lunghi nella parte prossimale della cellula, brevi nella distale (da LEVI).

lule sono sovrapposte in molti piani, e vanno diradando a poco a poco verso la periferia della zona d'invasione (fig. 3).

Però quando la coltura è rigogliosa, il coagulo si assottiglia, ed in qualche punto può scomparire; esso vien digerito dai fermenti prodotti dall'espianto e dalle cellule della zona d'invasione.

Specialmente nelle colture di epitelio la fluidificazione del coagulo è di alto grado; sovente vi appare un ampio vacuolo; e le cellule scorrono lungo il contorno di questo.

In alcune colture le cellule costituiscono intorno al tessuto un' aureola uniforme (figure 15-17), mentre in altre la migrazione o la riproduzione delle cellule è più attiva in una direzione piuttosto che in un'altra, e non di rado la migrazione è circoscritta a singoli parti del contorno dell' espianto.

La forma delle cellule della zona d' invasione in colture di mesenchima presenta grandi diversità (figure 3, 4, 34), che dipendono da tante cause, in parti conosciute, in parti oscure.

Considerando colture dello stesso tessuto, tali diversità non possono evidentemente essere inerenti alla forma originaria della cellula, bensì alle modalità con cui la locomozione di questa si compie; il che ci spiega, come perfino una stessa cellula cambia di forma a breve distanza di tempo, in rapporto a mutamenti nella proprietà del mezzo.

Noi riscontriamo nelle colture di mesenchima, cellule a forma affusata, o stellata, con lunghe e sottili propaggini di locomozione. Le varietà di movimento protoplasmatico meglio accessibili all' osservazione diretta son quelle che si trovano nelle colture a coagulo sottile, nelle quali le cellule sono molto espanse in superficie; in queste cellule distese in una lamina sottile, quando hanno forma allungata, il polo prossimale, cioè rivolto verso l' espianto, ha un orlo netto, rotondeggiante, invece verso il polo distale il protoplasma si espande in una lamina tenuissima a contorno festonato (figure 5-7, 9); questa emette propaggini che cambiano continuamente di forma (figure 5-7, 35). Oppure quando la cellula migra rapidamente, tutta la parte distale del protoplasma si estende in un nastro ed in un filamento, talora lunghissimo; questo colla sua estremità si espande in un velo tenue che emette propaggini.

Ma il movimento protoplasmatico al polo periferico della cellula può avvenire solamente quando essa è fissata ad un'altra contigua, oppure a filamenti di fibrina.

Altre volte il contrasto nell'attività protoplasmatica fra i due poli è meno evidente; la cellula non ha forma allungata, ma di lamina a contorno irregolare; essa è sottoposta a trazioni dirette in vario senso, e perciò non potrà spostarsi, finchè la

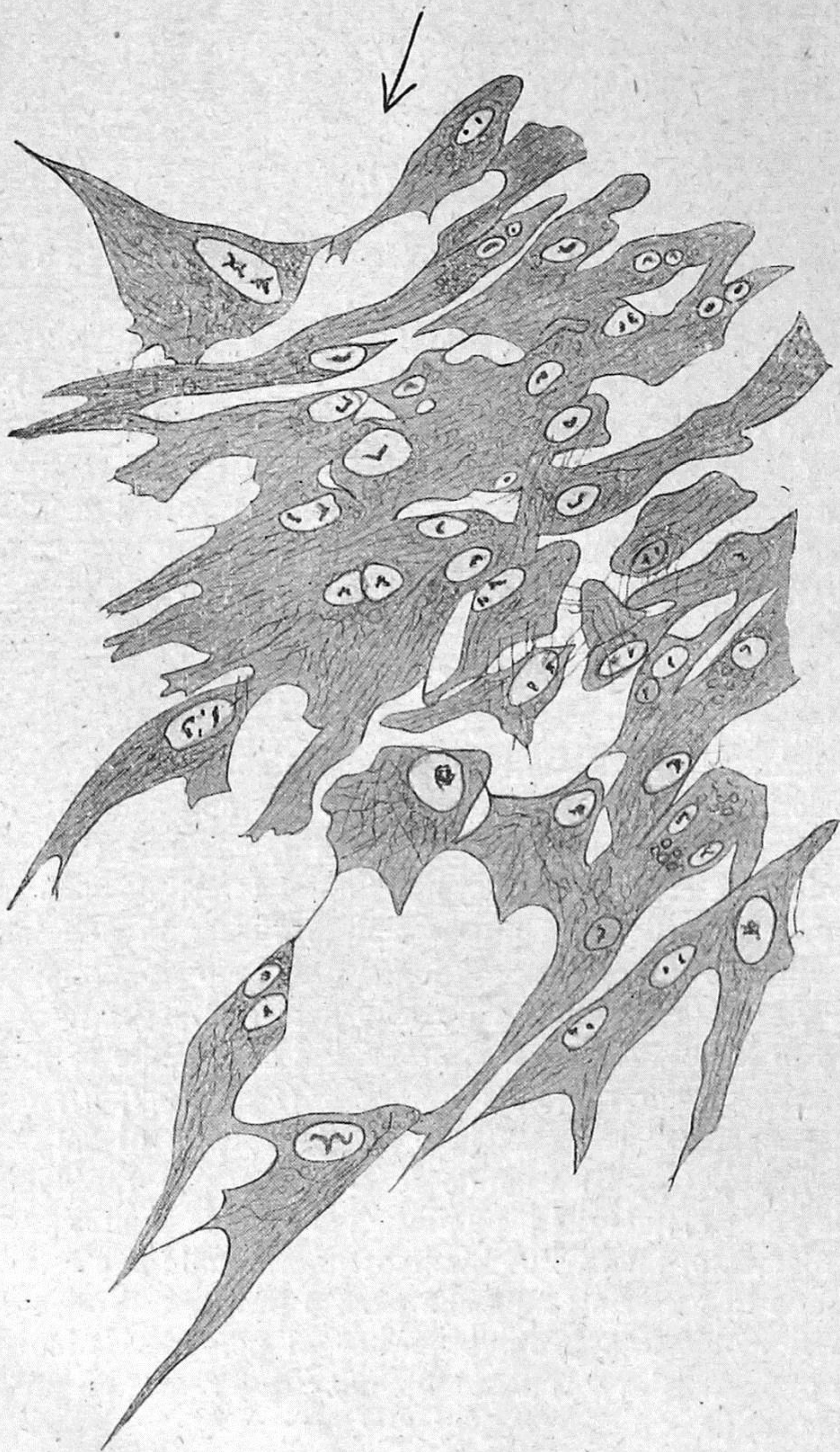


FIG. 8 - Da una coltura pura di mioblasti (in parte a costituzione sinciziale) con evidenti caratteri specifici (miofibrille), sviluppatasi da un espianto di cuore di embrione di pollo al 5° giorno, pulsante sino alla fine del 2° giorno. Ingr. circa 280 (da LEVI).

resultante delle forze non avrà vinta la resistenza che è opposta dalle connessioni colla cellula vicina. La migrazione avverrà, quando si sarà definita l'orientazione del movimento in una direzione determinata.

Variazioni non meno cospicue esistono nei rapporti vicendevoli fra le cellule; nelle colture ad elementi affusati, queste sono quasi sempre isolate, ed anche fra gli elementi stellati a sottili propaggini le anastomosi sono scarse (figure 2, 3). Da tali forme per una serie di gradi intermedi passiamo a colture, nelle quali la zona di invasione è occupata da una vera membrana a struttura sinciziale (figure 8, 18).

Allora tutte le cellule che fanno parte della membrana si spostano simultaneamente, cosicchè questa avanza nel coagulo come un complesso unitario; è quello che si verifica sempre nella zona d'invasione di culture di epitelio (fig. 18), e talora in quelle di fibroblasti e di elementi muscolari (figure 8, 14).

Oppure gli elementi che dall'espianto si spingono nel coagulo hanno la forma di masse protoplasmatiche a forma allungata con molti nuclei (figure 10, 13).

Il progressivo estendersi del sincizio dipende in tal caso prevalentemente da attività di locomozione delle cellule marginali, che trascinano quelle retrostanti, in minor parte per attività individuale, molto più limitata, di tutte le altre.

Ma quando un epitelio resta in contatto con del connettivo, che forma ad esso un substrato più resistente, il primo si estende, senza che le singole cellule diano segni di attività individuale; si ha in tal caso un movimento di massa dell'epitelio, che, secondo Oppel, dipenderebbe da contrazioni ed espansioni

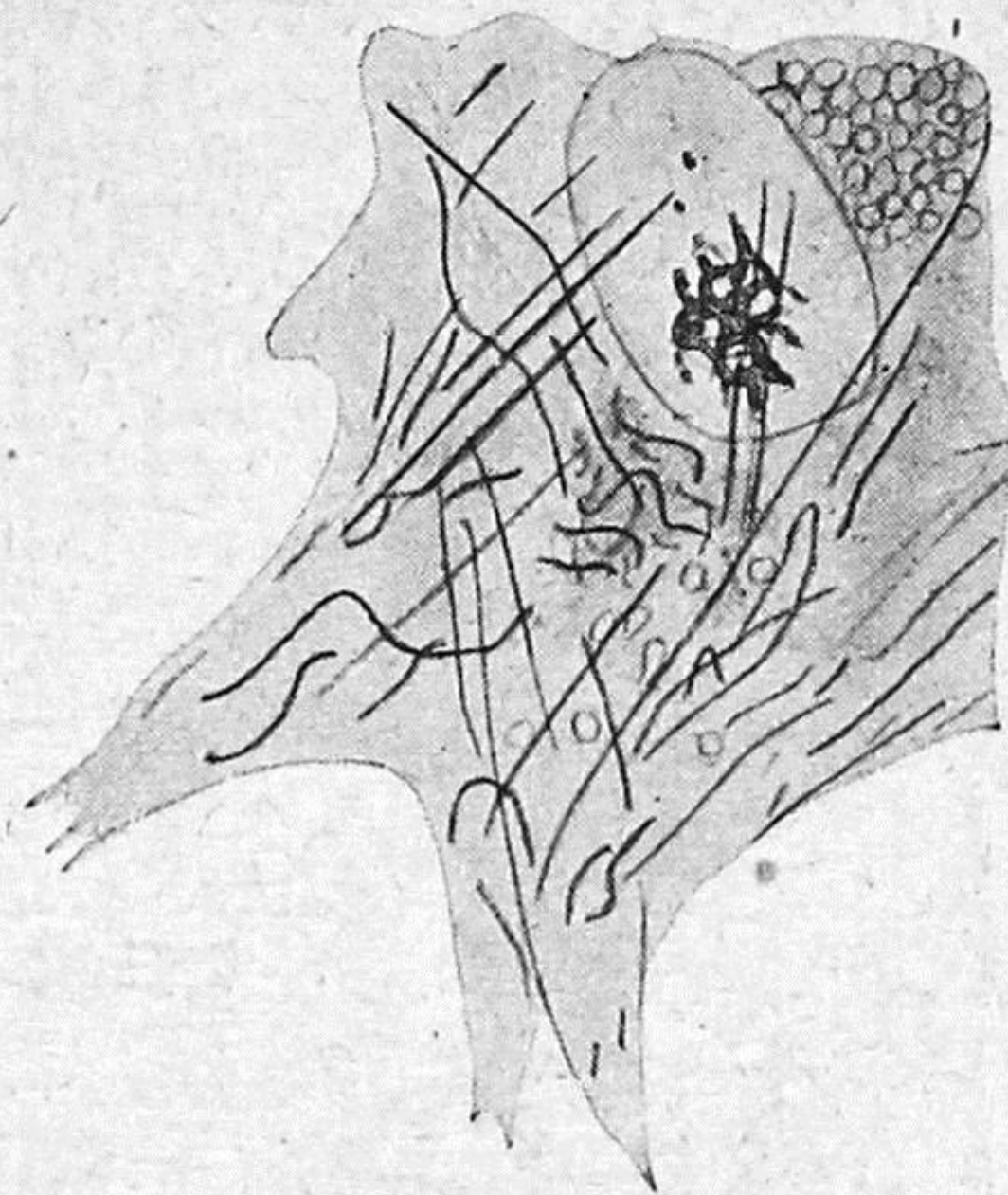


Fig. 9 - Mioblasto della stessa coltura da cui fu ritratta la fig. 8 con propaggini di locomozione: miofibrille orientate nella direzione di queste. Ingr. 800 (da LEVI).

alternate dal citoplasma; l'epitelio assottigliato scorre velocemente sul connettivo sottostante, senza che le cellule si moltiplichino e senza che si perda la continuità fra le medesime. Peters ed Oppel hanno dimostrato, che soltanto col movimento di massa delle cellule si spiega la rapidissima riparazione di perdite di sostanze prodotte nell'epitelio della cornea o di una mucosa.

RIASSUNTO

In una coltura di tessuto la parte centrale del frammento dell'organo (espianto) prima o poi regredisce per asfissia e perchè avvelenata dai prodotti catabolici delle cellule; essa si salva solamente se è molto piccola e se proviene da embrioni precoci. Soltanto la parte periferica dell'espianto sopravvive, ed anzi essa rappresenta la matrice della vera e propria coltura (zona fertile); infatti le sue cellule divengono mobili, riacquistando così una proprietà che possedevano nei primi periodi dell'ontogenesi, ma che avevano perduta differenziandosi nell'embrione; esse abbandonano l'espianto per portarsi nel coagulo e si moltiplicano per mitosi; la parte del coagulo che è invasa dalle cellule emigrate dall'espianto costituisce la zona d'invasione. I rapporti vicendevoli variano moltissimo in rapporto alla natura del tessuto, ma soprattutto alle proprietà del mezzo di coltura.

Le varietà della forma di una cellula dello stesso tipo dipendono generalmente da una più o meno vivace attività di locomozione.

CAP. IV.

Cause che determinano le differenze nei caratteri fra le colture - Morte delle cellule coltivate « in vitro ».

Le differenze nell'attività delle cellule nelle varie parti della zona d'invasione di una stessa coltura, nonché quelle spiccatissime fra le varie colture di uno stesso tessuto, dipen-

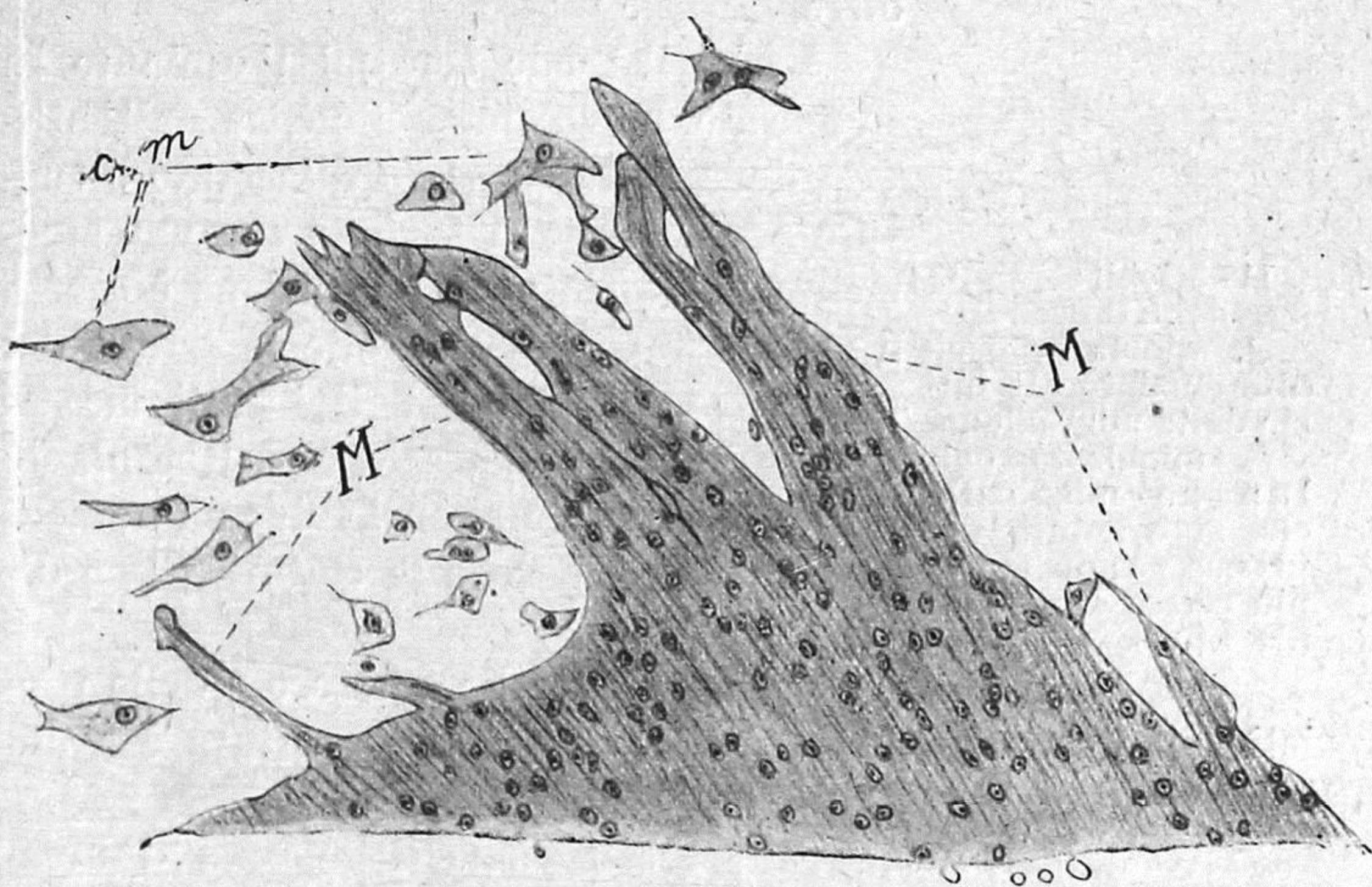


FIG. 10 - Da un espianto di cuore di embrione di pollo al 3° giorno, che fu conservato dopo 54 ore di vita e colorata. *M*, colonne a costituzione plasmodiale di mioblasti differenziati con miofibrille, che dall'espianto sono emigrati nel plasma. *cm*, cellule mesenchimali libere. Ingr. 340 (da LEVI).

dono, oltre che dalla proprietà del plasma, da altri fattori inerenti al modo di preparazione del tessuto.

Ripetiamo, (pag. 32), che colla denominazione generica di « attività » delle cellule coltivate « in vitro » noi indi-

chiamo tanto la velocità di migrazione dall'espianto nel coagulo, che il più rapido succedersi di divisioni cellulari.

Quanto quest'ultimo è più voluminoso, tanto più esteso è l'alone di cellule migrate (fig. 15), naturalmente entro certi limiti; perchè se il frammento sorpassa un certo volume, la coltura non si sviluppa affatto.

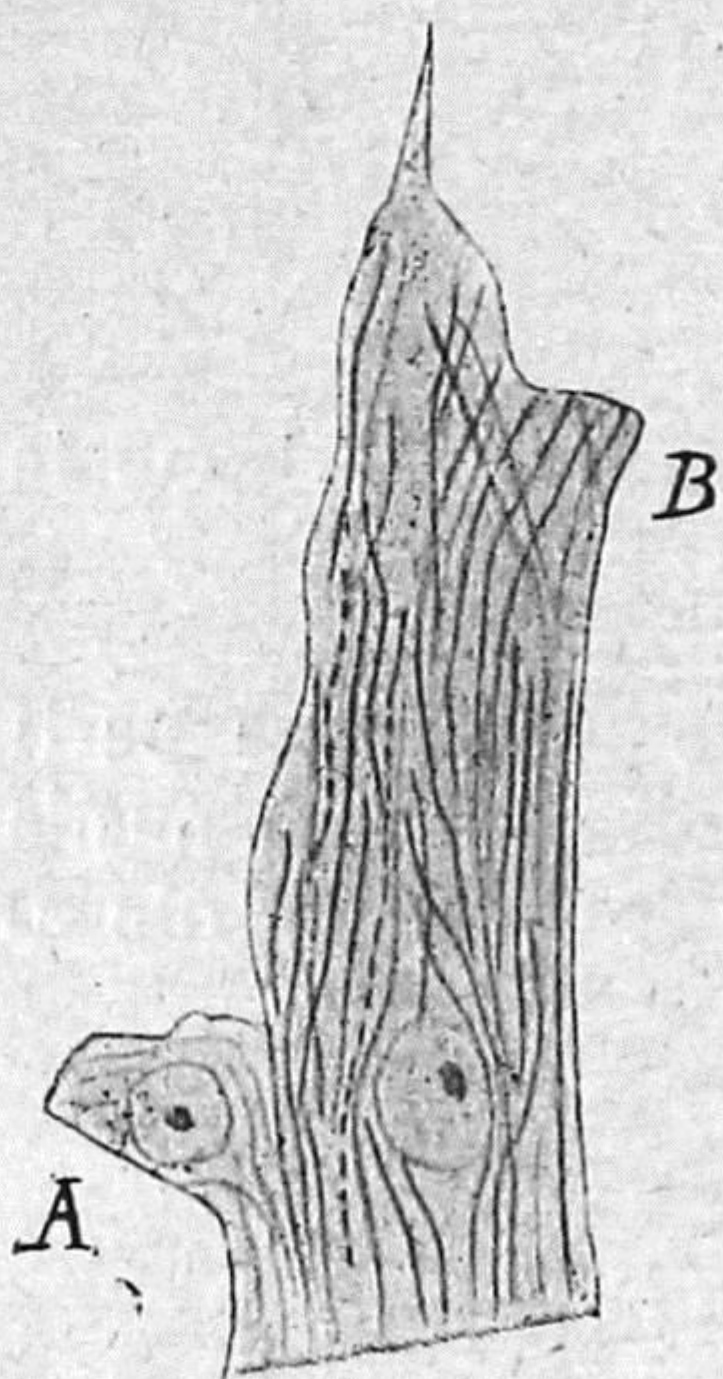


FIG. 11 - Mioblasti della fig. 10 più ingranditi.

A, mioblasta poco differenziato all'inizio della migrazione.

B, mioblasta con lunghe miofibrille che si è spinto nel plasma per un tratto più esteso. Ingr. 1000 (da LEVI).

L'*optimum* di migrazione cellulare fu constatato da Burrows con espienti di milza di pulcino di 1-1,5 di diam.; il che fa supporre che le cellule siano stimulate ad abbandonare il tessuto da sostanze prodotte da questo in varia quantità, a seconda del suo volume, e riversate nel mezzo di coltura; ma di ciò diremo più oltre.

Anche il modo con cui l'espianto fu preparato ha grande influenza sull'attività della coltura; se fu dilacerato o contuso anzichè esser ritagliato con uno strumento ben affilato, la migrazione è scarsa o fa difetto; evidentemente le cellule del tessuto sono sensibili agli insulti meccanici, e se la preparazione dell'espianto non fu accurata, ne sopravvive un numero troppo scarso, perchè la coltura possa divenire attiva.

L'influenza dello spessore e delle proprietà del mezzo sul grado di attività di una coltura è grandissima.

Burrows ha provato, che l'estensione della zona d'invasione è in ragione diretta dello spessore del coagulo; l'*optimum* di attività fu ottenuto in colture di frammenti di milza di 1-1,5 mm. di diam. in un coagulo di 0,2-0,3 mm. di spessore (fig. 16).

Ciò dipende certamente dal fatto, che quando il coagulo è sottile, le cellule della zona d'invasione sono in contatto più diretto coll'Ossigeno della camera d'aria (fig. 1), il che ne agevola in metabolismo.

Parimenti la diluizione del plasma con siero di sangue o con liquido di Ringer favorisce, a parità di altre condizioni l'attività della coltura (v. fig. 17); è probabile che in un mezzo meno denso le cellule incontrino minori ostacoli nella loro locomozione, e che anche la riproduzione cellulare sia agevolata.

Così la diminuzione nella concentrazione molecolare del mezzo favorisce l'accrescimento della coltura. Ma questo è

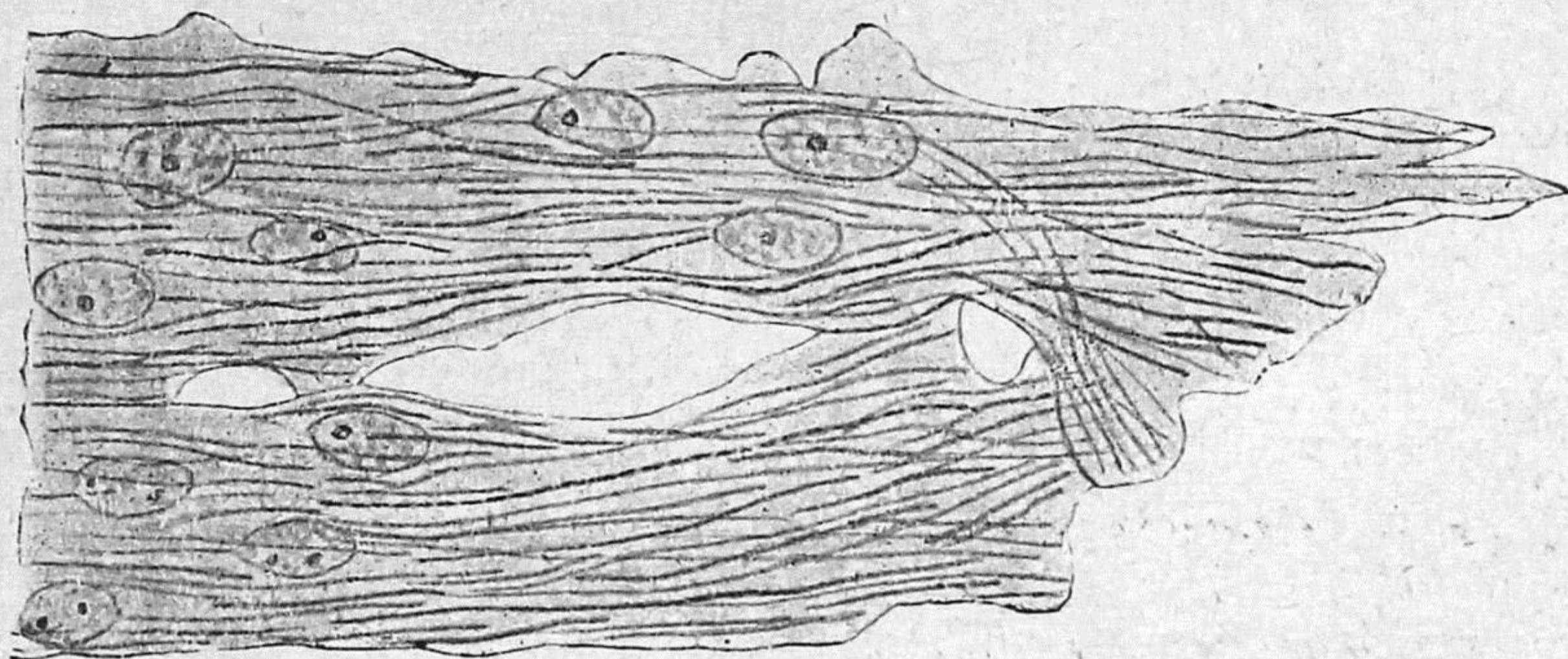


FIG. 12 - Mioblasti della coltura riprodotta a fig. 10 e 11 con lunghe miofibrille. Si noti il contorno irregolare della parte distale della massa di mioblasti, il quale è indice della sua attività di locomozione. Ingr. 1000 (da LEVI).

soprattutto attivato dall'aggiunta al plasma di estratto di organi di embrioni.

Recentemente Carrel dimostrò che esiste un rapporto costante e rigoroso fra l'attività della coltura e l'età dell'animale da cui il plasma fu tolto.

Infine altri fattori, di cui per il momento ci sfugge il meccanismo d'azione, hanno influenza sulla velocità di accrescimento della coltura.

Carrel ha osservato, che dopo una serie di seminazioni successive, senza causa apparente, la coltura diveniva bruscamente più attiva. Una coltura di elementi del miocardio al 3° mese fu circondata entro il periodo di 60 ore da un alone di cellule così esteso, da coprire una superficie 64 volte più grande del frammento originario.

Ma oltre che il numero, anche la forma delle cellule emigrate risente delle proprietà fisiche del coagulo.

Se la fibrina è abbondante ed è in forma di grossi nastri, le cellule sono affusate, se è scarsa, hanno contorno irregolare; inoltre nei coaguli densi appaiono masse protoplasmatiche allungate, a costituzione plasmodiale, con prolungamenti

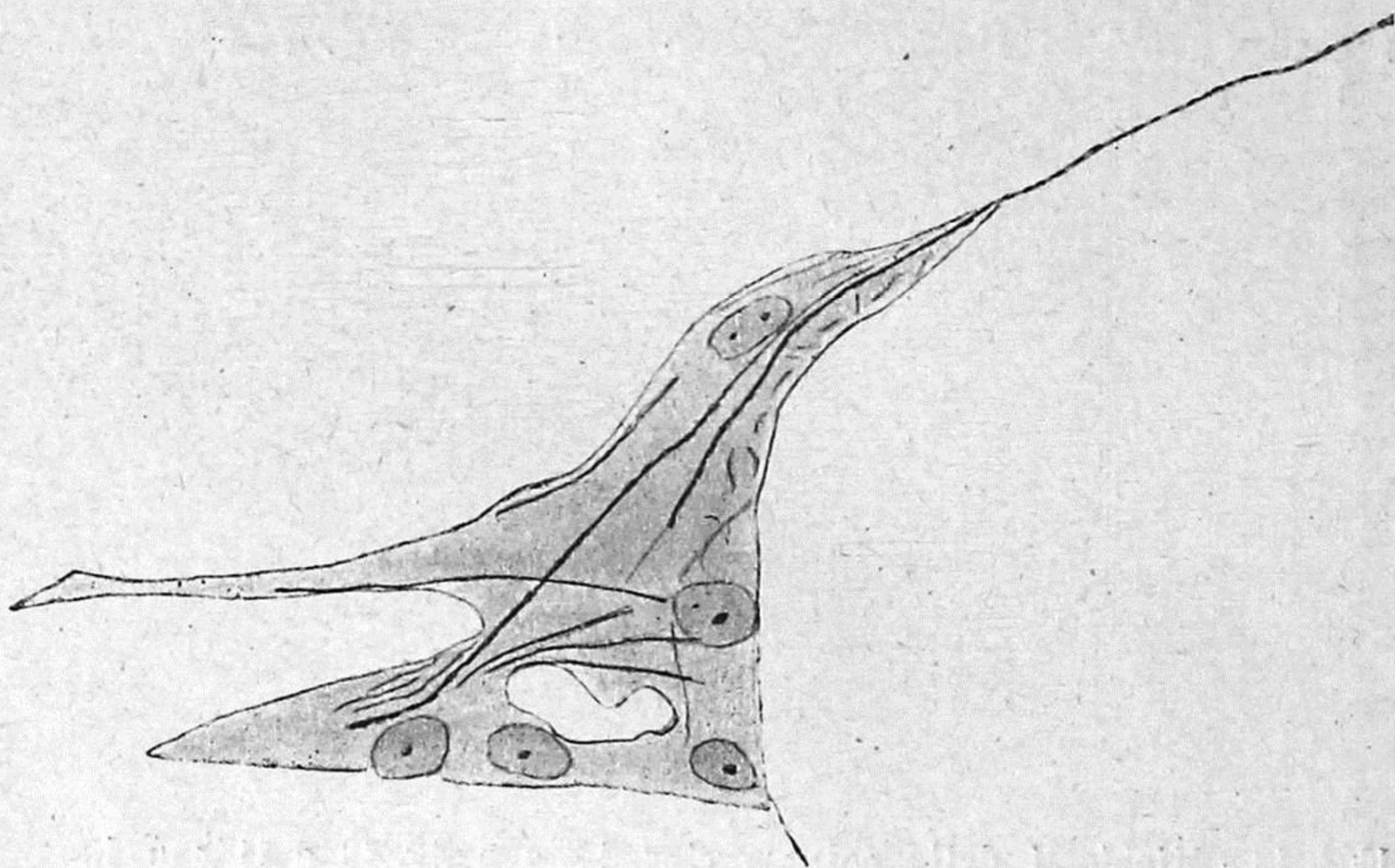


FIG. 13 - Da un espianto di cuore di embrione al 3° giorno che fu conservato dopo 3 giorni di vita e tagliato al microtomo. Una cellula muscolare a contorno triangolare tuttora in continuità con l'espianto: contiene qualche miofibrilla, la quale si prolunga in un lungo filamento. Ingr. 1200 (da LEVI).

conici; sembra che l'accrescimento di questi elementi sia ostacolato dalla densità del coagulo.

Uhlenhuth ha illustrato con maggior precisione l'influenza delle proprietà del mezzo sulla forma delle cellule. In colture di tegumento di Rana in coagulo denso le cellule epiteliali hanno forma poliedrica e restano a reciproco contatto, come nel tessuto, formando una membrana continua.

Se invece il mezzo è poco denso, le cellule divengono fusiformi, ed emettono prolungamenti ramificati. Infine quando delle cellule si trovano fra due mezzi di consistenza diversa, esse si appiattiscono aderendo all'oggetto più solido; l'esempio più incisivo ci è offerto dalla forma costantemente lamellare delle cellule che crescono fra vetrino e coagulo nelle colture

in plasma, come pure di quelle che aderiscono al vetrino nelle colture in mezzi liquidi.

In molte colture in plasma infatti, le cellule sono sovrapposte in vari strati; l'uno a forma lamellare sulla superficie inferiore del vetrino; a questo seguono elementi contenuti nello spessore del coagulo, e che sono disposti in uno o più strati,

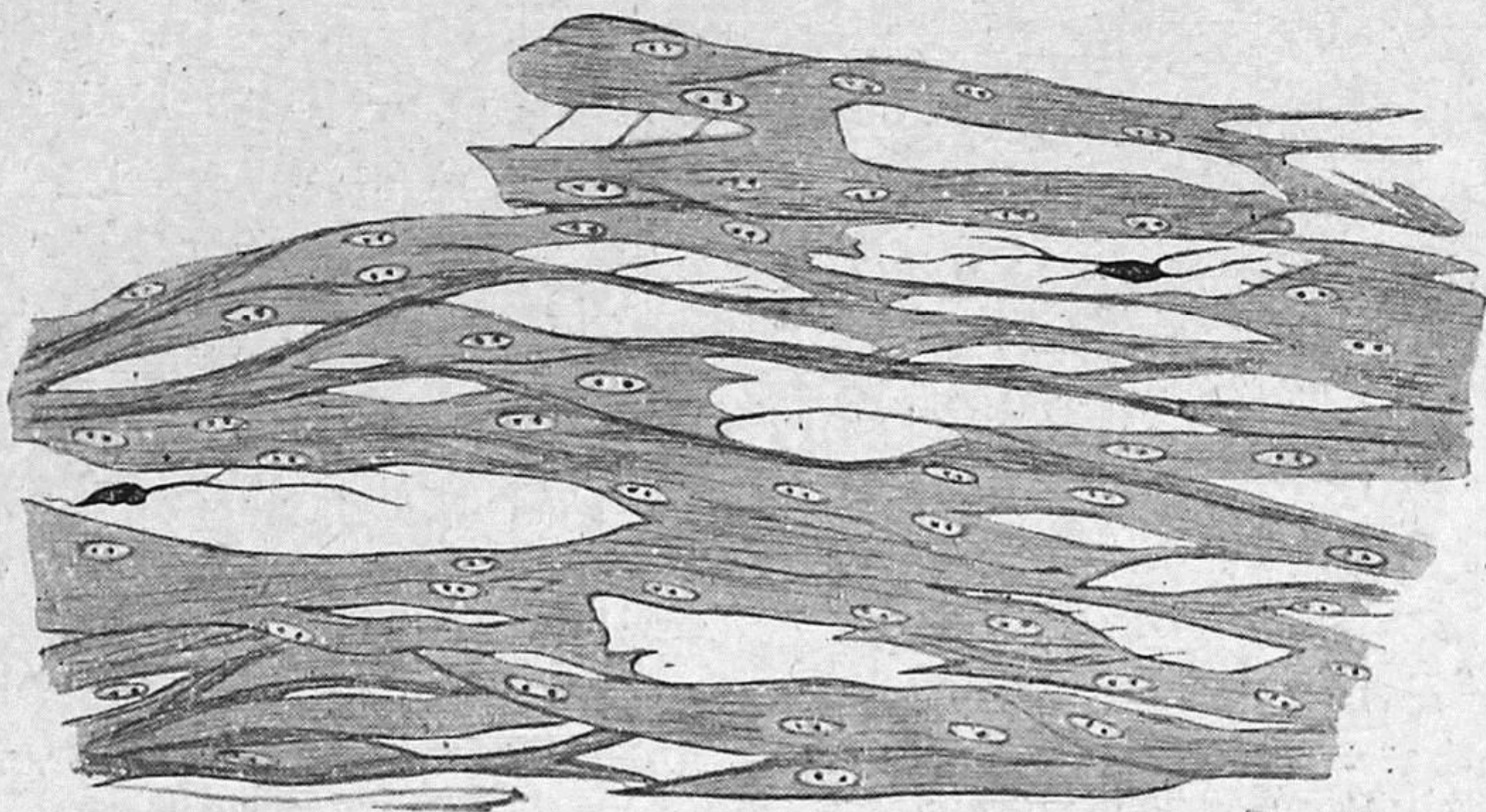


FIG. 14 - Sincizio di fibre con miofibrille, a costituzione plessiforme, emigrato nel coagulo, da un espianto, pulsante sino al 3° giorno, di cuore di embrione di pollo al 6° giorno. Ingr. 300 (da LEVI).

a seconda dello spessore di quest'ultimo; infine più profondamente troviamo talora un ultimo strato di elementi pure lamellari, sulla superficie inferiore del coagulo.

Noi abbiamo nel Capitolo precedente accennato al fatto, che la forma tanto diversa delle cellule contenute nella zona d'invasione nelle colture, è certamente l'espressione delle varie modalità con cui esse emigrano; le proprietà del mezzo hanno influenza ad un tempo sulla velocità di locomozione delle cellule, sui rapporti vicendevoli che esse contraggono, e sulla loro forma, appunto perchè l'una e le altre sono intimamente collegate.

Infatti la forma di una cellula si modifica solamente quando cambia di sede. Ma come si spiega l'influenza delle proprietà del mezzo di coltura sulla locomozione delle cellule e sulla loro forma?

Ciò è d'importanza essenziale, perchè vale a spiegarci

le condizioni che debbono essere realizzate, affinchè la coltivazione dei tessuti si produca. Vediamo anzitutto di rintracciare le cause, per cui le cellule del tessuto sono spinte ad abbandonare sin dalle prime ore la trama del tessuto, per dirigersi verso il coagulo.

Un coagulo di linfa o di sangue colla sua trama di filamenti di fibrina sottili, ma resistenti ed elastici, rappresenta un mezzo

eccellente affinchè su quei filamenti le propaggini di locomozione delle cellule possano inserirsi.

Harrison ritenne che così fosse veramente; la fibrina eserciterebbe sulle cellule una vera attrazione, che definì come stereotropismo, per effetto del quale le cellule migrano.

Se una cellula nuota in abbondante liquido, come accade sovente nelle colture in cui il plasma fu completamente digerito dai fermenti prodotti dalle cellule, la sua forma di-

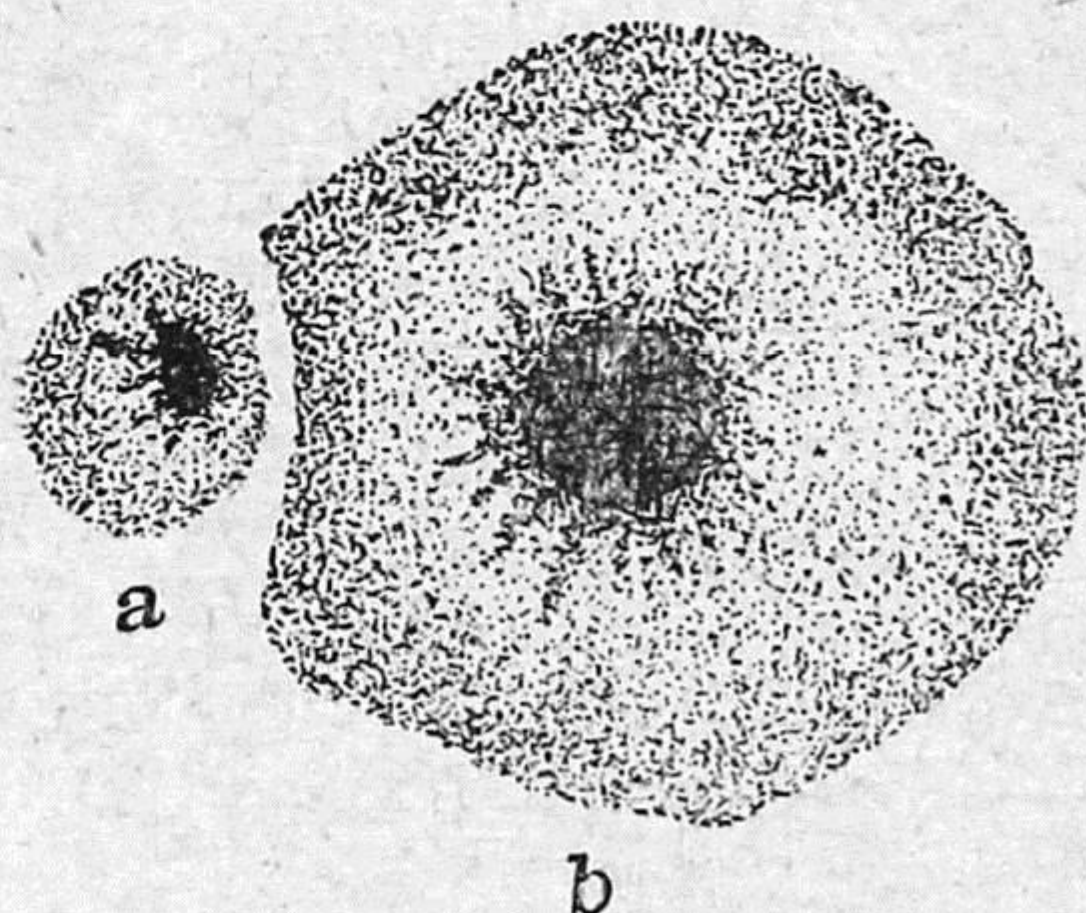


FIG. 15 - Due colture in plasma *a*, *b*, ritratte a debole ingrandimento, ottenute; *a* da un piccolo, *b* da un grosso espianto; in *b* la zona d'invasione è più estesa (da BURROWS).

viene subito sferica, ed esse non è più in grado di spostarsi; ma ricomincia a migrare non appena trova sul suo cammino un corpo solido; filamenti di fibrina, o fili di una tela di ragno; oppure se il liquido è disteso in uno strato sottilissimo la cellula trova un sostegno sulla superficie del vetrino e può strisciare su di essa.

La geniale interpretazione di Harrison, della funzione stereotropica esercitata dal mezzo sulle cellule, convalida quanto abbiamo già detto, che le sensibilissime differenze nella forma delle cellule che si riscontrano fra colture di uno stesso tessuto, sono inerenti ai rapporti fra la cellula ed il mezzo, sono cioè legate a condizioni meccaniche che si esplicano sulla cellula. La medesima vale adunque ad interpretare, oltre che la possibilità di migrazione delle cellule, anche le differenze nella loro forma; a seconda che la cellula trova nell'ambiente filamenti più o meno numerosi o più resistenti, oppure una superficie

liscia, la sua forma può divenire rispettivamente affusata, stellata, lamellare.

Così pure si spiega il fatto a cui accennai, che se l'epitelio viene coltivato assieme a del connettivo, il primo mantiene la propria forma specifica, perchè trova nel secondo un sub-

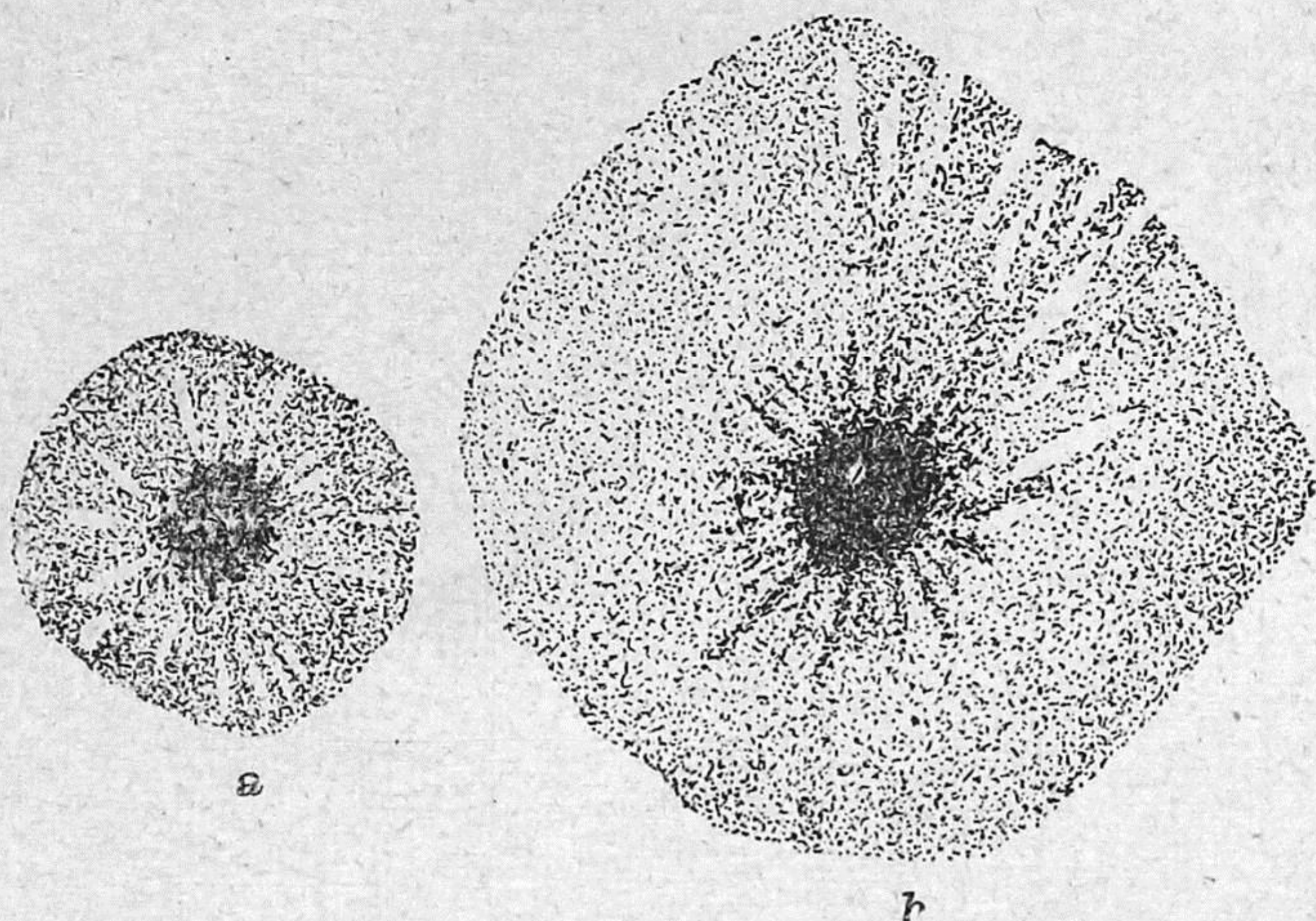


FIG. 16 - Due colture *a* e *b* in plasma, ritratte a debole ingrandimento, ottenute da espianti di eguale volume; ma in *a* lo spessore dello strato di plasma è di 1,6 mm., in *b* di 0,3 mm.; nella seconda la zona d'invasione è molto più estesa (da BURROWS).

strato consistente, mentre la perde quando i due tessuti vengono separati.

Però la presenza di un supporto solido è condizione necessaria ma non sufficiente per la locomozione delle cellule. Burrows, seguendo le idee di Jacques Loeb, ritiene, che lo stereotropismo non è un vero tropismo, visto che in questo caso non esistono linee di forza. Se una cellula si distende sopra una superficie solida, tale contatto non basta a modificarne la posizione, perchè i punti di contatto opposti vengono ad essere egualmente stimolati; per determinare un mutamento di posizione, quei punti debbono essere eccitati in modo differente; dimodochè la presenza di un substrato solido, rappresentato nelle colture dai filamenti di fibrina del coagulo, oppure dal vetrino, non bastano a spiegarci la locomozione della cellula,

nè i mutamenti di forma, i quali ne rappresentano le manifestazioni più appariscenti.

Certamente l'Ossigeno dell'aria esercita un'azione chemiotropica sulle cellule; queste nel frammento di tessuto essendo sovrapposte in molti strati soffrono per mancanza di Ossigeno e perciò sono attratte verso la superficie inferiore

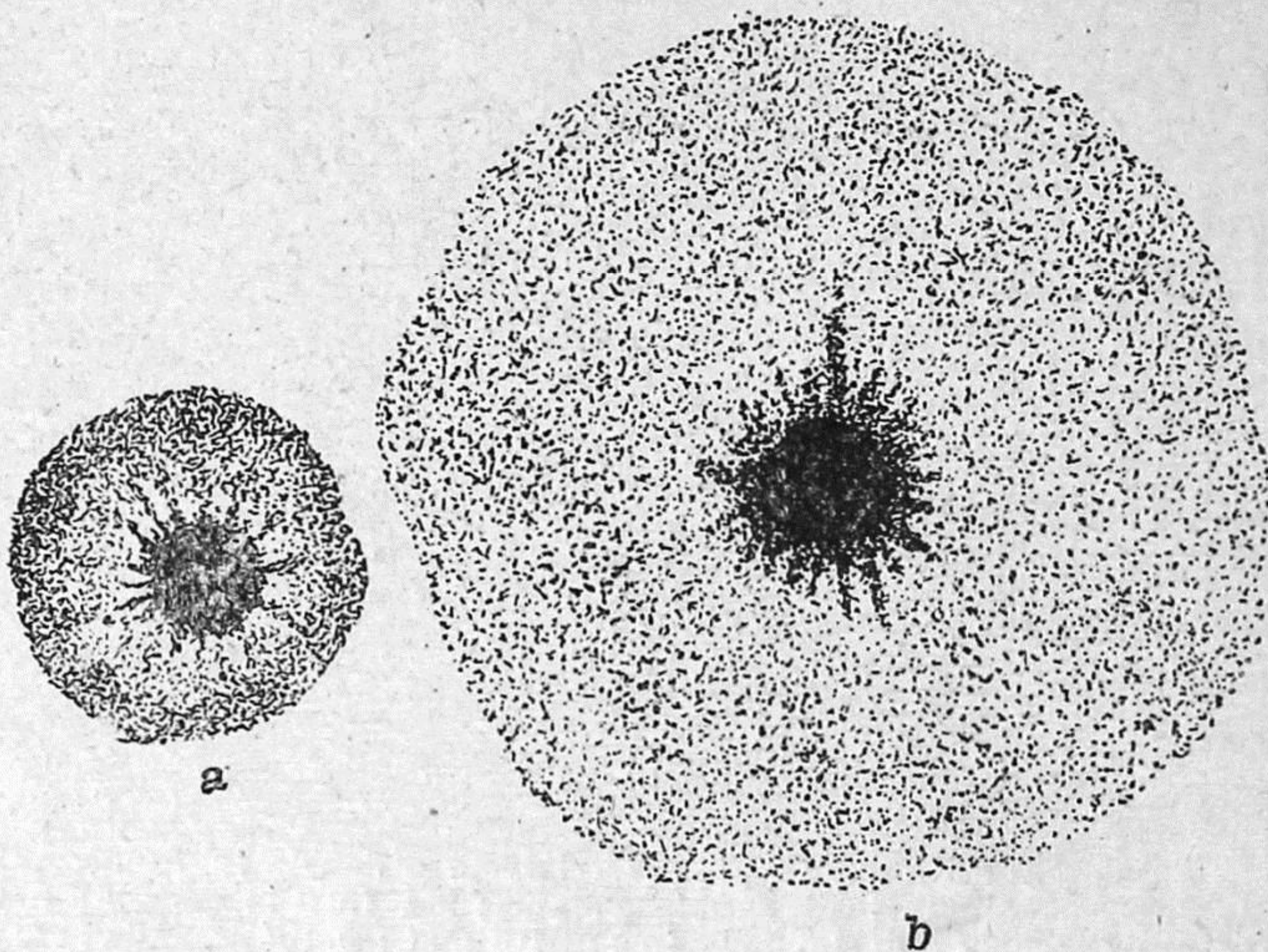


FIG. 17 - Due colture *a* e *b* in plasma, ritratte a debole ingrandimento, ottenute da espianti di egual volume; ma la coltura *a* fu ottenuta con plasma puro, la coltura *b* con plasma diluito con siero nella proporzione di 1:9 (da BURROWS).

del coagulo, ove quest'ultimo è in diretto contatto coll'aria contenuta nella cella di vetro.

Ma ciò vale a spiegare lo spostamento delle cellule del tessuto del coagulo, mentre non ci rende ragione dell'ulteriore migrazione delle cellule in quest'ultimo.

Dapprima Burrows suppose, che la cellula si portasse dal tessuto nel plasma, perchè vi trova il nutrimento necessario alla sua vita; ma questa spiegazione cade di fronte al fatto, che le cellule emigrano anche in mezzi liquidi inorganici, ove esse trovano un nutrimento meno completo che nel tessuto.

Più tardi Burrows modificò le proprie vedute: gli stimoli alla locomozione delle cellule sarebbero determinati dalle so-

stanze di rifiuto prodotte dalle medesime, le quali si spargono nel mezzo, formandovi microscopiche correnti di diffusione; *prodotti catabolici acidi eccitano un polo della cellula a ritirare i prolungamenti o ne impediscono l'espansione, una corrente di mezzo fresco stimola il polo opposti ad emetterli. E' per questa ragione che una cellula isolata in una goccia di plasma non cambia di posizione, mentre se due cellule si collocano l'una vicina all'altra si allontanano.*

Tale supposizione è la più adatta a spiegare la costante tendenza da parte delle cellule ad emigrare dal tessuto verso il coagulo, ed a spostarsi sempre più verso la periferia della coltura.

Processi regressivi e morte nelle cellule coltivate in vitro.

Quando la coltura risente bruscamente l'influenza di agenti nocivi fisici e chimici, tutte le cellule della zona d'invasione cessano di esistere; i movimenti protoplasmatici si arrestano immediatamente, il protoplasma va incontro in un periodo relativamente breve a profonde alterazioni ed il nucleo non è più visibile, ma la forma della cellula non si modifica tanto profondamente.

Questo si osserva ad es. quando la temperatura del termostato, in cui è contenuto il microscopio, oltrepassa bruscamente la temperatura di 46-48°. Romanese ha illustrato questa varietà di alterazione della coltura, dipendente da elevazione della temperatura; dapprima la periferia della cellula in locomozione presenta qua e là qualche piccola gemma, per cui il suo contorno diviene prima finamente dentellato, poi sfumato, i prolungamenti più esili divengono invisibili, quasi che si sciogliessero nel mezzo circostante, poi tutto il protoplasma diviene più trasparente; rimane una tenue ombra di quello che era l'elemento originario, e tale si conserva per ore e giorni immobile ed immutata. Ma può anche accadere che la cellula scompaia, quasi che si fosse fusa nel plasma circostante.

La regressione e la morte della cellula presenta invece caratteri diversi, quando gli agenti nocivi agiscono sulla coltura con minore intensità. Quest'è quello che si verifica inesorabilmente in tutte le colture lasciate a sè, quando le cellule

della zona d'invasione sono lentamente uccise dai prodotti del catabolismo cellulare, a meno che la loro vita non venga salvata col lavaggio e coll'aggiunta di un mezzo nutritivo fresco (pag. 24).

Sin dai primi giorni moltissime cellule della zona d'invasione degenerano, ma ciò non influisce in modo appariscente sull'estensione della coltura, perchè le cellule morte sono sostituite da altre in parte emigrate dal tessuto, in parte provenienti da divisione di altri elementi.

Ma dopo il 4° giorno e sovente anche prima, al 3° giorno, l'attività degli elementi sopravviventi rallenta, e ben tosto la proporzione numerica fra le cellule viventi e sane e quelle in degenerazione, s'inverte in favore delle seconde, e la regressione si estende con progressione tanto rapida, che ben tosto nessun segno di vita si manifesta più nella coltura.

Le proprietà del mezzo hanno un'influenza rilevante sulla durata della vita delle colture; quelle in coagulo sottile sono molto attive, ma vivono meno di altre a coagulo spesso, e le ragioni sono intuitive; nei coaguli sottili i prodotti catabolici delle cellule, i quali hanno un'azione nefasta sulla loro vita, si accumulano in uno spazio più ristretto, e perciò sono più concentrati. Così pure in coaguli lassi, ottenuti con plasma diluito, la coltura è più attiva, ma la sua vita è più breve.

La morte della coltura può avvenire molto prima; già dopo 36-48 ore, per cause varie; più frequente di ogni altro l'inquinamento con germi, avvenuto accidentalmente durante l'allestimento della coltura.

Di solito questo impedisce la migrazione delle cellule nel coagulo, cosicchè nessun segno di attività si nota al margine del tessuto; evidentemente in tal caso la presenza di germi uccide le cellule del tessuto sin dalle prime ore, e la coltivazione del tessuto è completamente fallita.

Ma può anche accadere, o perchè i germi erano scarssissimi, dimodochè dovettero trascorrere uno o più giorni prima che si riproducessero in quantità tale da esercitare un'azione dannosa sulla coltura, sia perchè si trattava di microrganismi non troppo nocivi alla vita delle cellule, che la coltura continui a vivere, pur essendo inquinata, per due e perfino per tre giorni.

Se le cellule della zona d'invasione non soccombono ad un agente che le colpisce bruscamente, esse possono presentare delle alterazioni strutturali compatibili per un certo tempo colla vita; i movimenti protoplasmatici continuano, per quanto rallentati, e talora si riproducono per mitosi. Una delle alterazioni più comuni è la metamorfosi adiposa. Si noti però che la presenza di grasso non sempre è segno di alterazione; qualche piccola goccia di grasso si trova in alcune cellule di quasi tutte le colture, sin dal primo giorno, ed esse continuano a vivere senza mostrare altri caratteri regressivi.

Così pure nelle colture a cellule affusate e stellate la presenza di gocce adipose anche voluminose è un reperto comune; i movimenti di locomozione non soffrono veruna limitazione; i globuli di grasso non aumentano di volume; durante la mitosi rimangono stazionarie e possono essere trasmesse in una od in tutte due le cellule figlie.

Talora, secondo Burrows, queste inclusioni di grasso scompaiono dalle cellule, il che dimostra anche meglio, che esse non sono un segno di alterazione della cellula.

Quando invece il grasso appare subito in forma di numerose e minute goccioline, e quando esse rapidamente invadono tutto il citoplasma, risparmiando solamente le propaggini più distali, il movimento protoplasmatico rallenta, e finisce coll'arrestarsi; e da quel momento le cellule più non si riproducono.

Le goccioline di grasso visibili nelle colture viventi danno con metodi microchimici adeguati la reazione dei grassi neutri; i lipoidi cominciano ad apparire solamente durante l'autolisi postmortale (Krontowsky e Polew).

Un'altra varietà di alterazione regressiva della cellula è caratterizzata dalla comparsa di molti vacuoli, i quali determinano un rigonfiamento del corpo cellulare, e l'arresto dei movimenti protoplasmatici.

Oppure l'alterazione si manifesta colla comparsa di granulazioni proteiche, provenienti da trasformazione dei condriosomi. Talora questa può essere di lieve grado e compatibile colla « restitutio ad integrum »; altre volte si estendono a tutto il citoplasma, ed anche in tale caso i movimenti protoplasmatici rallentano e finiscono coll'arrestarsi.

Tutte queste alterazioni, quando non sono reversibili, cul-

minano colla morte della cellula; ma è ben difficile di precisarne il momento; l'arresto della locomozione non è un criterio sufficiente, perchè non di rado i movimenti protoplasmatici cessano per qualche tempo per cause imprecisabili, per riprendere più tardi.

Quando la morte delle cellule della zona di invasione è preceduta da lente alterazioni regressive, esse retraggono poco a poco le propaggini e tendono ad acquistare una forma sferica; la struttura del citoplasma non è più riconoscibile, e questo appare gremito di grosse gocce refrangenti; in un punto o nell'altro del contorno sono emesse in modo esplosivo grosse gocce ialine, ed altrettanto rapidamente retratte (Romanese).

Fenomeni analoghi furono riscontrati durante la telofase della mitosi (Burrows e Levi), ed essi furono posti in rapporto con un abbassamento della tensione superficiale, in seguito al quale la parte fluida del citoplasma si separa per un istante dalla parte granulosa.

Ma mentre in tal caso l'emissione delle gemme è accompagnata dallo strozzamento equatoriale, quando invece questo fenomeno si produce in elementi in regressione, si ha l'immobilità assoluta della cellula, il che fa supporre che esso segni il momento della sua morte.

Per qualche tempo la parte periferica ialina del citoplasma si distingue dalla centrale granulosa; ma più tardi, probabilmente per fatti di autolisi, la prima scompare, e della cellula non rimane che un piccolo gruppo di goccioline refrangenti.

Nelle colture lasciate a sè, è adunque inevitabile la morte per autolisi di tutti gli elementi in un periodo di tempo relativamente breve.

Ma con vari espedienti tecnici si può prolungare la vita della coltura; alcuni di questi furono già rammentati nel Capitolo III.

Il più semplice è di conservarle a bassa temperatura; una coltura, come un organo separato dal corpo (v. pag. 9), se mantenuto in ghiacciaia a temperatura vicina a 0°, può vivere a lungo, sino ad un mese, e forse più, di vita latente; la migrazione e la riproduzione cellulare si arrestano, ma riacquistano

l'attività originaria, se la coltura viene riportata nel termostato alla temperatura di 39°.

Ciò convalida quanto abbiamo detto, che le cellule muoiono rapidamente nelle colture per l'accumularsi nel plasma dei prodotti catabolici; a bassa temperatura le attività delle cellule si deprimono, e quelle sostanze si riducono ai minimi termini.

Così pure col metodo di Burrows, di far passare attraverso alla coltura una corrente di siero di sangue o di liquido di Ringer, questa vive molto di più, perchè i prodotti di rifiuto vengono continuamente allontanati.

Infine col metodo del rinnovamento della coltura (pag. 24), noi possiamo prolungare la vita all'infinito; ripetendo il procedimento ogni 2-3 giorni, Carrel e più tardi Ebeling riuscirono per 10 anni consecutivi ad ottenere una serie di colture provenienti tutte da un unico frammento di cuore.

RIASSUNTO

A parità di altre condizioni il grado di attività della coltura è in ragione diretta del volume del frammento espantato, almeno sino ad un certo limite (di 1,5 mm. di diametro). Inoltre, sempre a parità di condizioni, l'attività della coltura è inversamente proporzionale allo spessore del coagulo; infine la diluizione del plasma, e più ancora l'aggiunta di estratto di organi di embrioni attivano immensamente la coltura.

Condizione indispensabile, ma non sufficiente, alla migrazione delle cellule è la presenza di un supporto dotato di una certa consistenza; lo stimolo alla locomozione delle cellule è determinato da correnti di diffusione che si stabiliscono nella coltura; prodotti catabolici acidi eccitano un polo della cellula a ritirare i prolungamenti; mentre il plasma fresco ricco d'Ossigeno stimola la cellula ad emetterli.

La morte delle cellule della zona di invasione può avvenire bruscamente o lentamente, e le modificazioni strutturali delle medesime sono nei due casi diverse. Se la morte della cellula avviene lentamente, questa è preceduta dalla comparsa di piccole goccioline di grasso e di vacuoli; il momento della morte è indicato da retrazione delle propaggini e successivamente dalla forma sferica che la cellula acquista.

CAP. V.

Comportamento di vari tessuti specificamente differenziati nelle colture « in vitro ».

1. Tessuto connettivo di sostegno.

Nelle colture di cui ci siamo fin qui occupati nell'illustrazione dei caratteri generali degli elementi cresciuti « in vitro » sono le cellule fisse di connettivo che abbandonano l'espianto, prendono forma eguale a quella dei fibroblasti dei tessuti di cicatrice, si adunano nel plasma e vi si riproducono; ma a differenza che nei processi di cicatrizzazione, le cellule mantengono caratteri embrionali, continuano a spostarsi verso la periferia del coagulo, finchè non muoiono; e non hanno il potere di formare una sostanza intercellulare.

Quest'è l'eventualità più comune nelle colture di tessuti di embrioni inoltrati oppure di animali adulti; nei primi giorni può accadere che accanto alle cellule fisse di connettivo accorran nel coagulo elementi epiteliali, muscolari lisci e striati; ma le prime, e per la più vivace attività proliferativa ed anche perchè più resistenti, ben tosto prendono il sopravvento sugli altri elementi. Ed anzi Carrel ha dimostrato, che col metodo delle seminagioni successive in serie si può ottenere dopo qualche tempo una coltura pura di elementi connettivali.

I fibroblasti migranti sono elementi sdifferenziati, nei quali la proprietà, che è tipica per le cellule del connettivo, di costituire una sostanza intercellulare, per le condizioni dell'ambiente non può manifestarsi, *ed essi possiedono invece in alto grado e senza limitazione alcuna* (vedi pag. 24) *il potere di moltiplicarsi*. Cosicchè sembra probabile che, analogamente a quel che si suppone per gli elementi dei neoplasmi maligni, essi conservino all'infinito i caratteri embrionali.

In qualche caso sottili fibre si dipartono da cellule mesenchimali coltivate in vitro ed esse si accrescono per movimento ameboide della loro estremità distale, acquistando una lunghezza considerevole (G. Levi); se queste fibre possono essere paragonate a quelle dei tessuti di sostegno dell'embrione, è dubbio.

Solamente in condizioni speciali, non ancora ben determinate, fu constatata da M. e W. Lewis la differenziazione nelle colture di fibre collagene, con modalità simili e quelle conosciute per i tessuti di sostegno dell'embrione; cioè per trasformazione della zona periferica di cellule mesenchimali appiattite.

Inoltre in colture di connettivo sottocutaneo di conigli adulti, appaiono nella zona d'invasione anche quelle speciali cellule del tessuto di sostegno, che furono denominate clasmotociti (cellule migranti in riposo secondo Maximow).

Infine anche le cellule degli endoteli vasali possono migrare dall'espianto in colture di fegato di embrioni di pollo; questi elementi costituiscono uno strato aderente al vetrino, in forma di una rete di cellule allungate riunite fra di loro da propaggini (W. Lewis).

2. *Epiteli e ghiandole.*

L'accrescimento degli epiteli in vitro avviene con modalità diverse dal connettivo di sostegno; in colture di epidermide, di intestino, di epitelio pigmentato della retina, di pericardio ecc., si diparte dall'espianto una lamina continua, costituita da cellule epiteliali a forma lamellare. Ho di già espresso la mia convinzione (pag. 37) sul modo con cui la migrazione di queste membrane avverrebbe, per attività protoplasmatica delle cellule più periferiche, le quali trascinano dietro di sé quelle retrostanti. Cosicchè la forma tipica dell'epitelio non cambia molto nella zona d'invasione; la sola modificazione è l'appiattimento rilevante delle cellule (fig. 18).

Però al 2° e 3° giorno di vita della coltura il contatto reciproco fra le cellule più periferiche della membrana epiteliale può divenire meno intimo; vi si formano sovente degli interstizi; si costituisce a poco a poco un reticolato a trabecole grossolane, dal quale si separano singole cellule; allora queste

acquistano forma irregolare e diventano simili a fibroblasti; e da questo momento le cellule epiteliali, oltre che perdere i caratteri specifici, emigrano libere nella zona d'invasione.

Le ricerche compiute sulla coltivazione di ghiandole in vitro sono scarse. Secondo Champy in colture di rene di coniglio

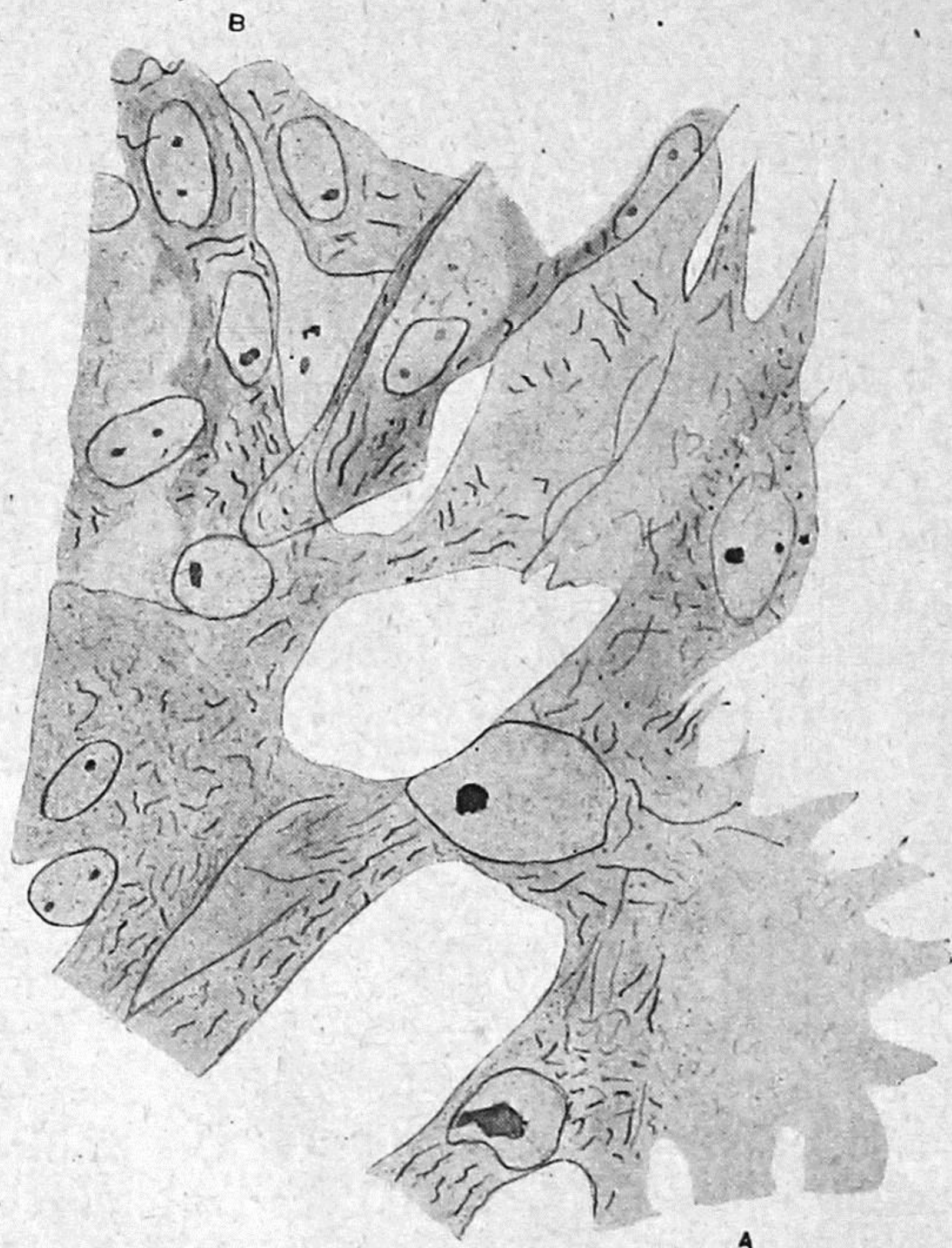


FIG. 18 - Membrana proveniente dall'epitelio dello stomaco di un pulcino al 9° giorno, conservata al principio del 3° giorno di vita; gli elementi più periferici (in *A*) emettono propaggini estremamente appiattite ed accennano a separarsi dalla membrana. Ingr. 800 (da LEVI).

l'architettura tipica delle cellule si modifica gradatamente, tendendo ad assumere il carattere embrionale, quanto più si procede dall'espianto verso la zona fertile e da questa nella zona d'invasione; ed i fenomeni di differenziazione sono nelle linee generali analoghi, sia che si tratti di rene fetale od adulto.

Nella massa di tessuto, che si è spinta nel coagulo, non vi è più traccia della struttura del rene; elementi mesenchimali ed epiteliali si confondono al punto, da non poter essere distinti l'uno dall'altro; la sdifferenziazione iniziata nella zona fertile è divenuta completa nella zona d'invasione.

Invece Carrel e Burrows in colture di rene e di tiroide di cani e di gatti constatarono la migrazione nel coagulo di tubuli provenienti dal parenchima renale.

In colture di fegato di embrioni di pollo R. Stocking Lynch ha visto, che nelle cellule epatiche che emigrano dall'espianto si mantiene per qualche tempo, almeno in parte, la struttura tipica; la loro forma si modifica per l'emissione delle propaggini, che ne rendono possibile la migrazione, ma esse si riconoscono facilmente da altri elementi, per la forma granulare dei mitocondri e per la presenza di granuli di pigmenti biliari.

3. *Coltivazione del tessuto muscolare.*

Pezzetti di atrio o ventricolo di embrioni di pollo dal 3° al 10° giorno d'incubazione coltivati colla tecnica consueta pulsano ritmicamente per molti giorni, sino all'11°; nei primi 4 giorni il ritmo è regolare, nei successivi intermittente; in colture preparate col metodo del lavaggio con siero di sangue (vedi pag. 24 e seg.) il ritmo rimane regolare sino al 30° giorno.

La frequenza del ritmo è maggiore per l'atrio che per il ventricolo; di 150 sino a 220 pulsazioni per il primo, di 50 sino a 150 per il secondo.

Braus ha coltivato il cuore di giovani larve di Rana e ne seguì le pulsazioni durante 2 settimane; queste si mantennero regolari sino al 10° giorno.

L'accrescimento del tessuto del cuore di Pollo e di Rana non è ostacolato dalla pulsazione.

Ciò è singolare, se si riflette, che nel frattempo la costituzione tipica del miocardio non può a meno di essersi assai modificata; infatti dall'esame istologico dell'espianto appare, che in parecchi punti gruppi di fibre muscolari sono regredite ed in altri essi si vanno sdifferenziando e proliferano; e

dalla periferia dell'espianto molti elementi avanzano verso il coagulo.

Ma basta che in qualche punto le fibre rimangano integre, perchè il frammento continui a contrarsi.

Talora in colture al 2°-3° giorno la pulsazione si localizza ad una zona ristretta del miocardio, il che indica, che la regressione del tessuto fu in questo caso più di alto grado che in altri.

In colture di cuore di embrioni di 2-3 giorni si distingue adunque, come in qualsiasi coltura: 1° il tessuto originario, che qua e là conserva i propri caratteri specifici strutturali e funzionali; esso infatti pulsa e vi si vedono ben distinte le miofibrille striate; vi sono inoltre delle parti regredite, più estese nel centro del frammento; 2° una zona fertile al limite fra il tessuto ed il coagulo, nella quale si nota una tendenza alla sdifferenziazione, ed una proliferazione talora molto attiva; 3° una zona d'invasione contenente elementi migranti, isolati, oppure riuniti da ponti protoplasmatici, che differiscono soltanto per caratteri accessori, da quelli del mesenchima, ma che rappresentano veri elementi del miocardio (mioblasti) migranti, con lunghe propaggini.

Cosicchè in alcune colture di miocardio gli elementi della zona d'invasione si sono sdifferenziati, al punto che a stento si distinguono dei fibroblasti, e come questi emigrano emettendo propaggini.

Nella zona d'invasione di altre colture di miocardio (figure 8 e 9) vediamo elementi, che per la presenza delle miofibrille hanno ben netta l'impronta di mioblasti; ma sebbene essi siano in vari punti congiunti da ponti protoplasmatici, facilmente si liberano dalle loro connessioni ed emigrano isolati, emettendo prolungamenti non dissimili da quelle dei fibroblasti.

Altre volte infine il tessuto dell'espianto si prolunga nel coagulo in un sincizio che è cresciuto per « movimento di massa » (pag. 37) e che ripete più o meno perfettamente la struttura del miocardio embrionale (fig. 10-12-14).

Nei primi giorni di vita della coltura gli elementi della zona fertile e della zona d'invasione non si contraggono; si può avere l'illusione che questo avvenga, perchè il frammento

di cuore, essendo saldamente unito al coagulo, trasmette le sue pulsazioni a quest'ultimo, ma si tratta, ripeto, di un'illusione.

Durante questo periodo adunque, che si protrae sino alla 2^a settimana (Burrows), solamente il frammento di tessuto originario pulsa, mentre gli elementi che sono emigrati nel coagulo e quelli neoformati, non manifestano proprietà contrattili.

Come in qualsiasi altra coltura tale periodo è caratterizzato da un'attiva migrazione di cellule; poi questa si arresta e gli elementi della zona d'invasione si moltiplicano e si differenziano; inoltre, specialmente nelle colture sottoposte ad un permanente lavaggio (vedi pag. 24), Burrows ha constatato, che il *sincizio di cellule neoformate incomincia a contrarsi ritmicamente, e che il fenomeno si protrae sino al 30° giorno*; dapprima la pulsazione è estesa a tutto il sincizio, poi si localizza in due parti separate; in queste il ritmo finisce col non esser più sincrono, probabilmente perchè le cellule interposte hanno perduto oltre che il potere contrattile, anche la capacità di trasmettere lo stimolo alla contrazione.

Talora anche cellule isolate pulsano, ed il loro ritmo può essere indipendente da quello del sincizio. Pulsazioni di elementi separati del cuore, come pure di elementi di muscoli scheletrici di embrioni di pollo furono constatate anche da M. Lewis.

Dall'espianto crescono fibre muscolari in forma di gemme polinucleate a costituzione sinciziale, dalle quali sovente si staccano cellule isolate coi caratteri di mioblasti; le une e le altre presentano talora spontaneamente e per parecchie ore, altre volte soltanto dopo stimolazione, contrazioni ritmiche più o meno rapide (da 3 a 120 per minuto); *le fibre si accorciano e si ispessiscono colla tendenza da parte dei due estremi ad avvicinarsi.*

Anche le cellule muscolari lisce dell'amnios furono coltivate con successo da M. R. Lewis e ne furono studiate le contrazioni; una cellula fu perfino vista contrarsi durante la mitosi.

4. Tessuto nervoso.

La conoscenza delle modalità di accrescimento delle fibre nervose nelle colture fu la prima conquista ottenuta col nuovo metodo da Harrison, il quale da vari anni cercava di risol-

vere per vie nuove il problema dell'origine delle fibre nervose. Affinchè la differenziazione e l'accrescimento delle fibre nervose possa essere ben seguito al microscopio, occorre che

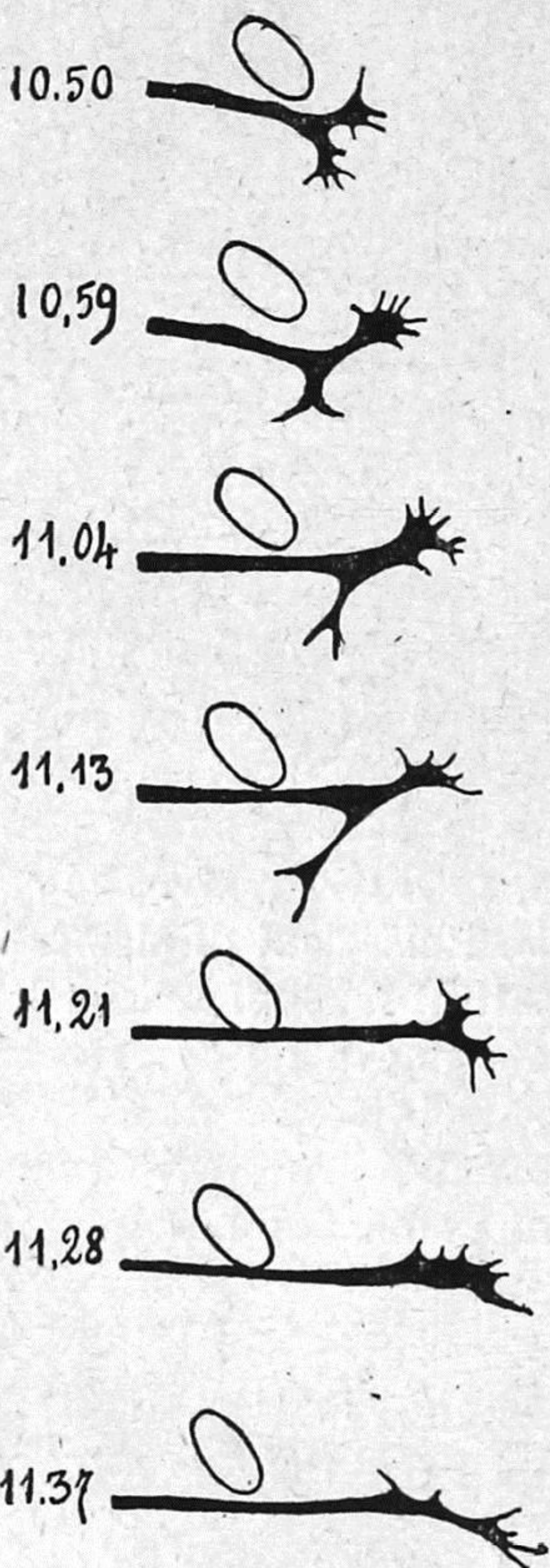


FIG. 19 - Sette immagini successive dell'estremità di una fibra nervosa in via di accrescimento in una coltura (in linfa) di 4 giorni di vita di ectoderma della regione branchiale di embrione di Rana, atte a dimostrare i mutamenti di forma e la progressione della fibra. Il corpuscolo rosso di cui fu disegnato il contorno, segna un punto fisso (da HARRISON).

l'espianto sia preparato con speciali cure; si otterranno buoni risultati dal midollo o dal rombencefalo di embrioni di pollo dalla 36^a alla 50^a ora; i frammenti debbono essere piccoli, di 0,1-0,2 mm. di diam., e verranno separati scrupolosamente dal tessuto circostante; se vi rimane del mesenchima anche in piccola quantità, questo prolifera, e maschera le sottili fibre nervose cresciute nel coagulo.

L'accrescimento delle fibre nervose in vitro si svolge in modo simile, almeno nelle linee generali, in espunti di embrioni di Rana e di Pollo.

Le fibre di Rana sono più tozze (fig. 19) e perciò i fenomeni di ameboidismo dell'ispessimento terminale, che segnano l'accrescimento della fibra, sono visibili anche con medi ingrandimenti; invece le fibre di embrioni di Pollo sono esili, e per seguire al microscopio l'attività ameboide dell'estremità libera, occorrono ingrandimenti più potenti (fig. 20-21).

Lungo il contorno dell'espianto di canal midollare di Rana e di Pollo si affacciano dei nuclei sormontati da un cappuccietto protoplasmatico; questo emette una propaggine ispessita alla sua estremità libera in una clava o mazza terminale, da cui si dipartono sottili appendici collate-

rali, le quali vengono poi retratte e poi di nuovo emesse (figure 19-21). Il modo con cui si svolge l'attività protoplasmatica dell'estremo della fibra offre grandi diversità; talora tutti i filuzzi terminali possono essere per qualche minuto retratti, quasi che l'attività della fibra subisse una sosta; oppure, anzichè

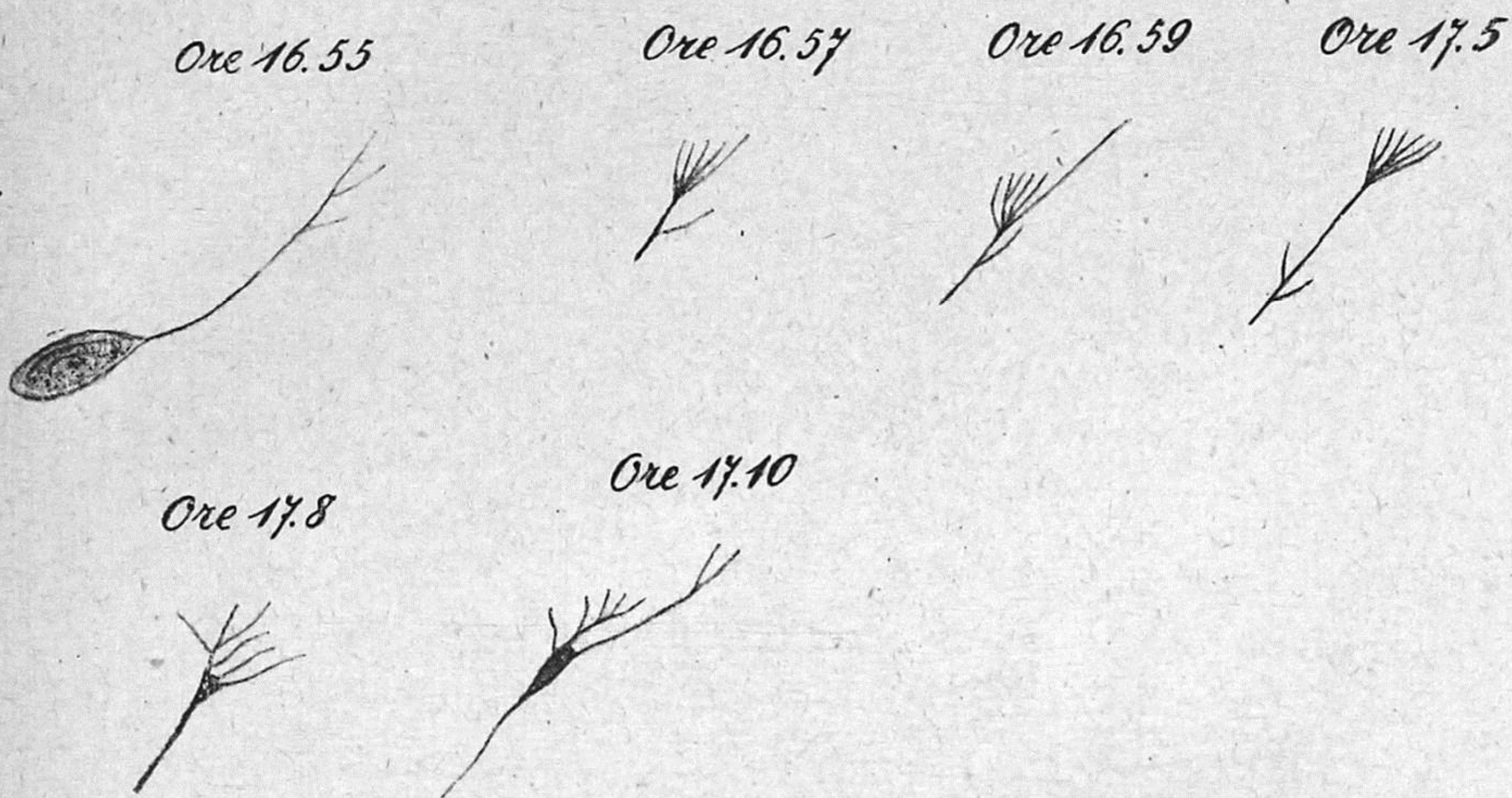


FIG. 20 - Modificazioni dell'espansione terminale di una fibra nervosa. Immagini ritratte ad intervalli di pochi minuti (è indicata l'ora in cui l'osservazione fu compiuta) in una coltura vivente di 6 ore di vita di corteccia cerebrale di embrione di pollo al 7° giorno; nella prima figura è disegnato anche il neuroblasta da cui la fibra si origina, nelle altre solamente l'espansione terminale (da LEVI).

lunghe propaggini (fig. 22), la fibra emette un fiocchetto di filuzzi numerosi ed esilissimi (fig. 20-21).

E' evidente, che abbiamo sotto gli occhi una varietà di movimento protoplasmatico, paragonabile a quello che determina la migrazione dei fibroblasti e dei mioblasti nel coagulo, ma che differisce da questo per vari caratteri, e si avvicina piuttosto al movimento di alcuni Protozoi.

Anche le conseguenze del movimento protoplasmatico sono nei due casi diverse; mentre i fibroblasti ed i mioblasti sono sempre elementi mobili, il neuroblasta non emigra mai nel coagulo, e se questo succede, si tratta di una migrazione pas-

siva; ed allora il neuroblasta perde la proprietà di differenziarsi ulteriormente e ben tosto regredisce.

Dimodochè, i primi segni di attività protoplasmatica si manifestano in modo simile nei fibroblasti e nei neuroblasti, cioè coll'emissione di un sottile filamento; ma nei secondi, a differenza che nei primi, quest'attività non determina alcun

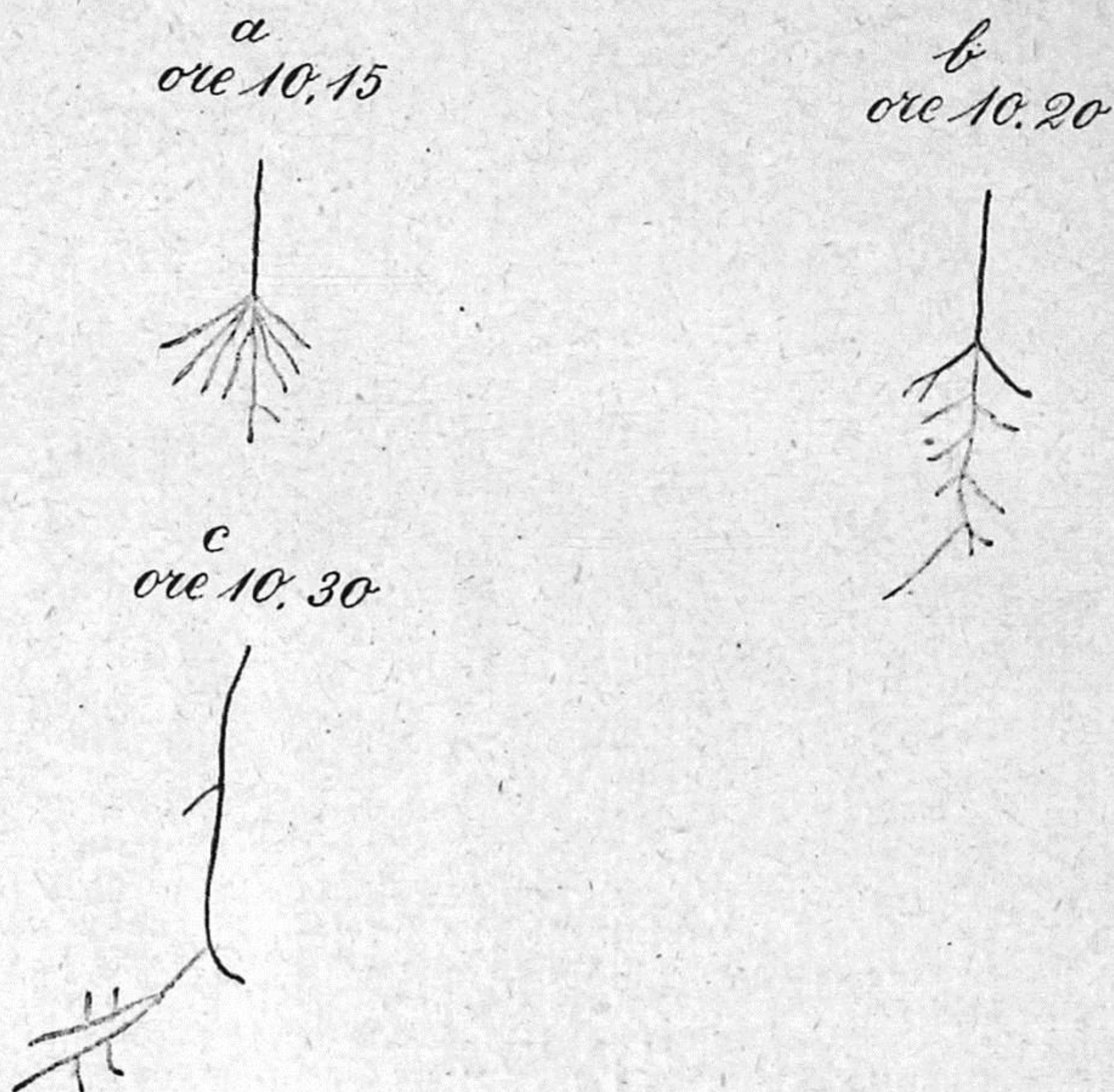


FIG. 21 - Modificazioni dell'espansione terminale di una fibra nervosa di una coltura di 19 ore di vita di rombencefalo di embrione di pollo al 4° giorno; le figure sono destinate ad illustrare la sua progressione (da LEVI).

spostamento della cellula, sia perchè il neuroblasta è più saldamente unito al tessuto delle altre cellule, sia perchè risponde agli stimoli formativi in modo diverso.

In qual modo il movimento ameboide dell'estremità libera del prolungamento del neuroblasta, destinato a divenire una fibra nervosa, ne determina l'accrescimento in lunghezza?

La via alla fibra che cresce è tracciata dalla trama di fibrina del coagulo; colle tenui propaggini che la sua parte

terminale rigonfia emette, essa va cercando per tentativi la strada più opportuna per poter avanzare.

Così si spiega perchè molti filamenti siano emessi e successivamente retratti; essi evidentemente non hanno trovato un sostegno abbastanza resistente sul quale fissarsi solidamente. Ma quando una delle appendici incontra un filamento di fibrina più robusto, essa si ingrossa, e tutta la massa protoplasmatica terminale finisce collo spostarsi in quella direzione.

Le fibre nervose possono anche crescere in mezzo liquido, purchè sia disteso in un tenuissimo strato: allora avanzano aderendo alla superficie del vetrino, il quale in tal caso sostituisce la funzione « stereotropica » della fibrina; W. ed M. Lewis lo dimostrarono per le fibre del simpatico.

Quando lo pseudopodo che ha trovato un sostegno, ha acquistato caratteri identici a quelli del rimanente della fibra, e dopochè la clava terminale si è spostata verso l'estremità, l'attività ameboide di quest'ultima prosegue nel modo già indicato. E così la fibra cresce ulteriormente con grande rapidità.

Secondo Harrison, la velocità di accrescimento delle fibre nervose di larva di Rana è in qualche caso molto grande, relativamente all'esiguità delle fibre (fig. 19): sino a 0,056 mm. all'ora.

L'accrescimento delle fibre nervose si protrae per alcuni giorni, cosicchè esse finiscono coll'avere una lunghezza rilevante, talora di qualche millimetro.

Le fibre nervose cresciute nel coagulo sono in tutto e per tutto identiche a quelle dell'embrione; esaminate nella coltura vivente esse hanno la caratteristica refrangenza e la struttura finamente fibrillare dei cilindrassi; inoltre esse ne pos-

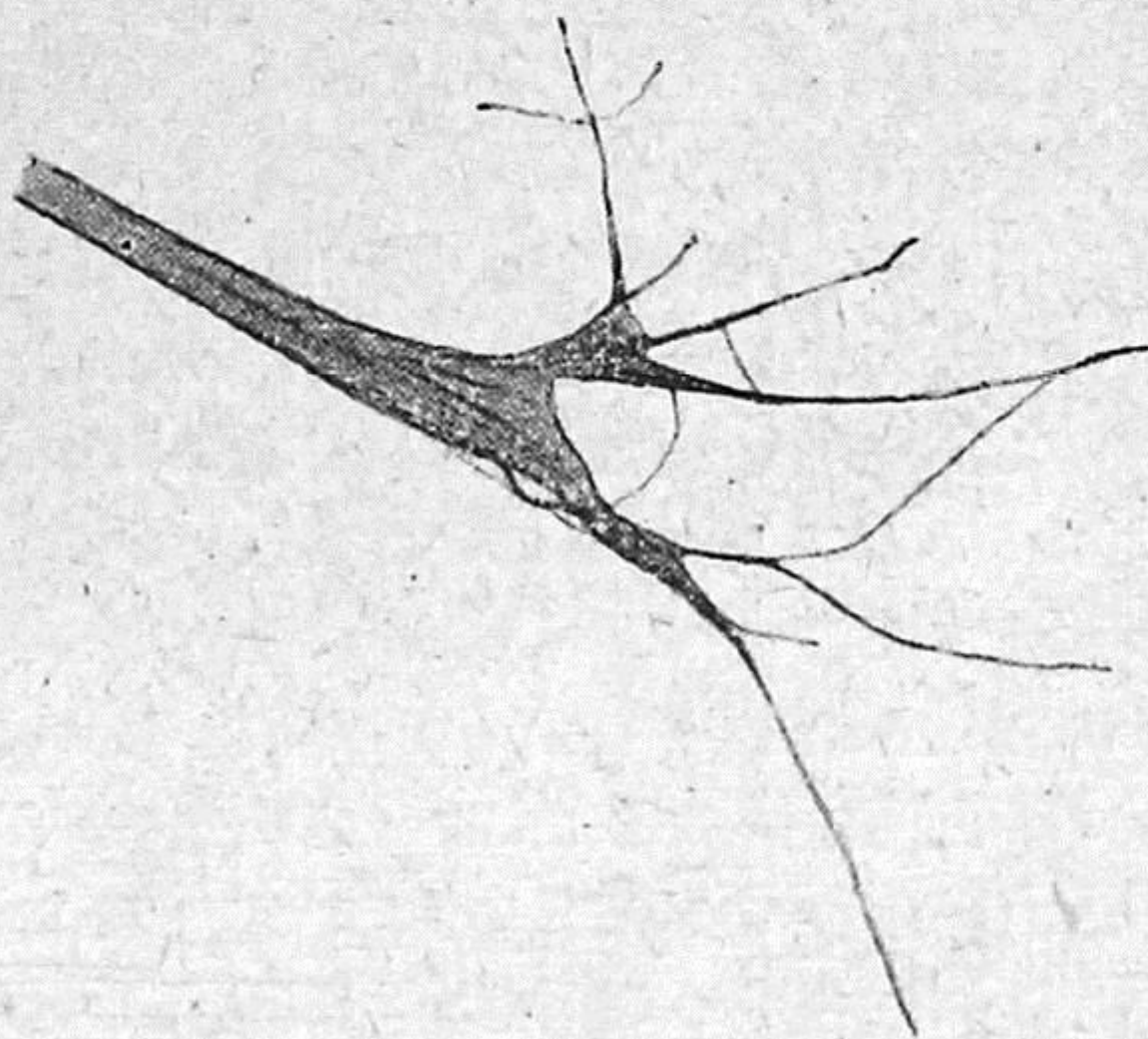


FIG. 22 - Espansione terminale a lunghi filamenti di una corta e grossa fibra. Da una coltura di embrione di pollo al 4° giorno, conservata dopo 45 ore di vita. Ingr. 1600 (da LEVI).

siedono le affinità microchimiche; fra tutte la più tipica, è quella di colorarsi coi sali di Argento, nel metodo detto fotografico di Cajal. Tutto ciò dà la certezza, che anche i cilindrassi cresciuti in vitro contengono quella speciale sostanza, che rappresenta per lo meno il costituente principale delle neurofibrille, considerata come specifica degli elementi nervosi, e che non trova riscontro in altri elementi dell'organismo.

Non di rado le fibre, anzichè affacciarsi isolate nel coagulo, si riuniscono in un fascio, nel quale sono raccolti i prolungamenti di numerosi neuroblasti; il fascio cresce come una massa compatta, ma dopo un certo tratto le fibre che lo costituiscono si dissociano e si ramificano, sì da ricordare il comportamento di un tronco nervoso in prossimità della sua espansione periferica.

Quasi sempre le fibre cresciute liberamente nel coagulo, si ramificano; talora i rami si mantengono indipendenti, più di sovente si anastomizzano. In questo particolare, che ha grande importanza per la conoscenza della costituzione del sistema nervoso, come diremo meglio nel prossimo capitolo, le ricerche di Harrison; di W. ed M. Lewis, e le mie non lasciano ombra di dubbio.

Io ebbi la ventura di seguire sotto il microscopio nella coltura vivente il modo con cui le anastomosi fra fibre distinte si costituiscono, sia fra fibre provenienti da divisione di un unico neurite, sia fra altre proveniente da cellule nervose distinte.

Talora le fibre emettono lungo il loro decorso, per attività ameboide, dei filamenti esilissimi, i quali possono dopo breve tempo regredire; in tal caso l'anastomosi è transitoria; ma se il filamento diviene più robusto, essa costituisce una vera fibra anastomotica (fig. 23-28).

Oppure l'anastomosi si stabilisce fra gli estremi distali liberi delle fibre; allora i due ispessimenti terminali di due fibre, oppure i due rami di divisione di una stessa fibra si dirigono l'uno verso l'altro, in grazia ai loro movimenti ameboidi, e si uniscono. Se le due espansioni terminali sono rigonfie, la massa protoplasmatica scorre lungo l'arcata che si è formata per l'anastomosi fra le fibre (fig. 23-28).

Prova più convincente, che non si tratta di semplice con-

tatto, ma di continuità di sostanza fra le due fibre, non la potremmo immaginare.

Le anastomosi possono essere definitive, ma non la sono necessariamente; dopo qualche tempo l'attività ameboide nella massa protoplasmatica, che riunisce le due fibre, si ridesta, e ciascuna di queste può riacquistare la propria indipendenza (fig. 28).

Quando varie fibre si anastomizzano in via definitiva — ed è l'eventualità più frequente — il coagulo è occupato da una vasta rete, nella quale l'individualità dei neuriti provenienti da cellule diverse non può essere rintracciata.

I cilindrassi cresciuti nel coagulo, oltre che per i caratteri morfologici, anche per le proprietà biologiche si avvicinano a quelli dell'organismo; Ingebritsen ha dimostrato, che se sono separati dalla cellula nervosa degenerano, e che essi sono in grado di ricostituirsi in vitro, come nell'organismo, per attività formativa del moncone centrale; cosicchè è *dimostrata la possibilità di una rigenerazione di fibre nervose cresciute in un coagulo di plasma.*

5. *L'accrescimento dei tessuti coltivati in vitro paragonato a quello dell'organismo.*

I fatti fin qui riferiti ci concedono di orientarci alquanto sul valore morfologico e biologico della coltivazione di tessuti.

Nella massa cellulare allevata artificialmente, che proviene da migrazione e da riproduzione del frammento di organo espiantato, non si ripetono mai tutti i caratteri di forma e di struttura di quest'ultimo.

Un organo ha una forma ed una grandezza costante e tipica per la specie; i tessuti che lo compongono, elementi specifici e di sostegno, nervi, vasi sanguigni e linfatici, sono distribuiti con armonia perfetta ed adeguata alla funzione specifica; così pure tipica è la disposizione e la grandezza delle sue unità morfologiche (vedi pag. 3): lobuli, lobi, se si tratta di una ghiandola.

Ebbene nulla di tutto questo rimane nella coltura; nella medesima sin dalle prime ore il frammento di organo regredisce in gran parte, oppure, se sopravvive, i rapporti vicen-

devoli fra le parti si turbano profondamente: poi l'accrescimento dell'uno o dell'altro tessuto prevale; oppure se vari tessuti divengono attivi contemporaneamente, ne risulta un complicato intreccio di elementi disparati, i quali sovente finiscono col perdere i propri caratteri specifici; cosicchè dell'architettura dell'organo originario non rimane traccia.

Perciò pur accettando, come abbiamo fatto, la denominazione generica di coltura di tessuti (vedi pag. 19), riconosciamo con Champy, che quando si coltiva un frammento di rene, di fegato, di midollo spinale, non si riproduce nè la forma, nè l'architettura di quegli organi.

Sarebbe perciò un errore il confondere la coltivazione di tessuti in vitro coll'esperienze di sopravvivenza e di differenziazione di parti di organi di embrioni di Anfibi isolati, (pag. 10), come pure colla ricostituzione di organismi interi da frammenti di spugne isolate (pag. 7).

Mentre nelle esperienze di Born, di Giardina, di Ekman il frammento di coda e l'abbozzo di cuore acquista una forma simile, se non identica a quella che avrebbe avuto nell'embrione, lo stesso abbozzo se coltivato colla tecnica di Harrison subisce le profonde metamorfosi sulle quali ci siamo fin qui intrattenuti.

Il mutamento dell'architettura dell'organo espantato dipende da dissociazione nell'attività dei suoi tessuti; fino al momento in cui l'organo fa parte integrante dell'embrione, i suoi tessuti si accrescono con ritmo armonico ed adeguato alla costituzione della forma tipica; invece dopo l'espianto, quando gli umori nutritivi hanno cessato di circolare, ed il frammento si nutre e respira in modo diverso dal normale, i vari tessuti in presenza di un ambiente insolito, si comportano in modo atipico; e per di più l'accrescimento e la migrazione di ciascuno di essi — tessuto muscolare, di sostegno, endoteli vasali — sarà di varia entità.

Ma se è indiscutibile che la forma e l'architettura di un organo determinato si cancella nelle colture, noi sappiamo che i caratteri dell'uno o dell'altro dei tessuti che fanno parte dell'organo, possono talora mantenersi invariati, o modificarsi in vario grado.

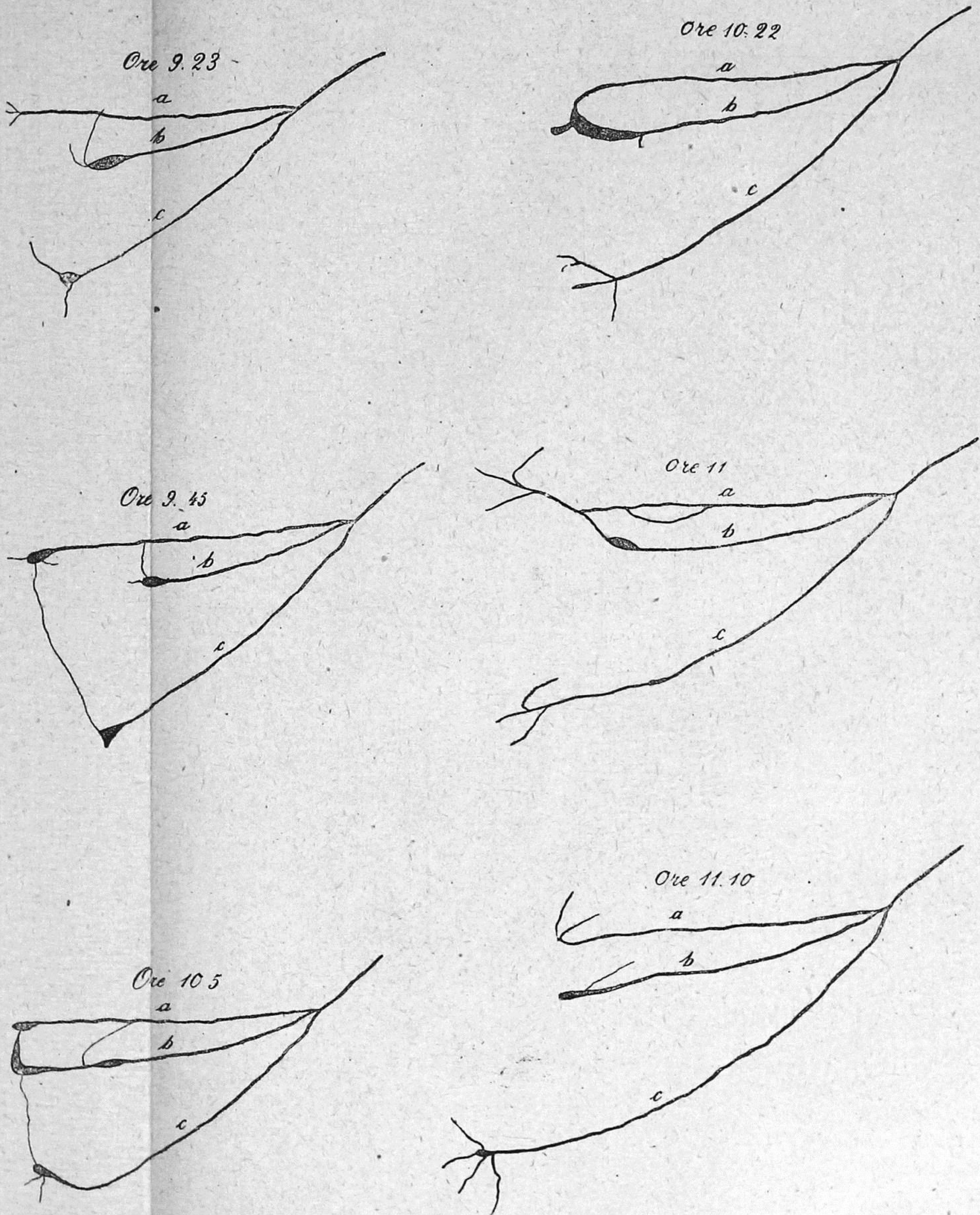


FIG. 23-28 - Trasformazioni di 3 rami provenienti dalla divisione di una fibra nervosa, in una coltura di rombencefalo di un embrione al 5° giorno, alla 18^a ora di vita, ritratte dalla coltura vivente (è indicata l'ora dell'osservazione). Unioni transitorie per sottili filuzzi; anastomosi ad arcata fra due fibre, ma anche questa scompare (da LEVI).

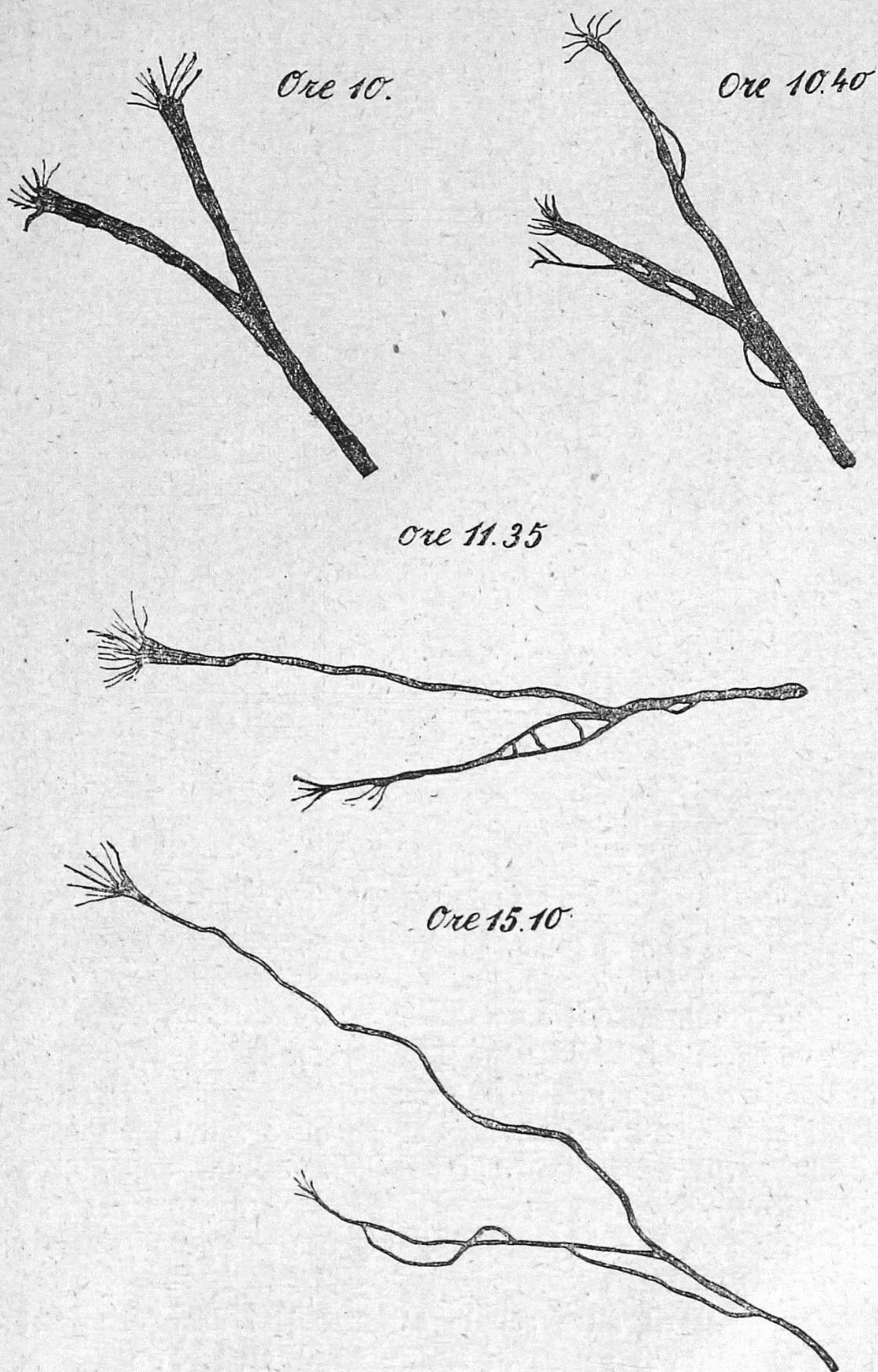


FIG. 29-32 - Trasformazione dei due rami di divisione di una fibra che conducono al loro accrescimento in lunghezza, congiunto ad assottigliamento; costituzione di maglie per estensione di vacuoli apparsi nello spessore delle fibre. Da una coltura di 30 ore di vita di rombacefalo di embrione di pollo al 4° giorno (da LEVI).

1° L' eventualità più frequente è, che il tessuto che invade il coagulo non abbia neppur la rassomiglianza più lontana con quello da cui proviene; quando in un frammento di cuore, di rene o di altri organi embrionali od adulti le cellule del connettivo di sostegno, divenute migranti, si affollano nel coagulo trasformandosi in fibroblasti, noi ritroviamo una massa

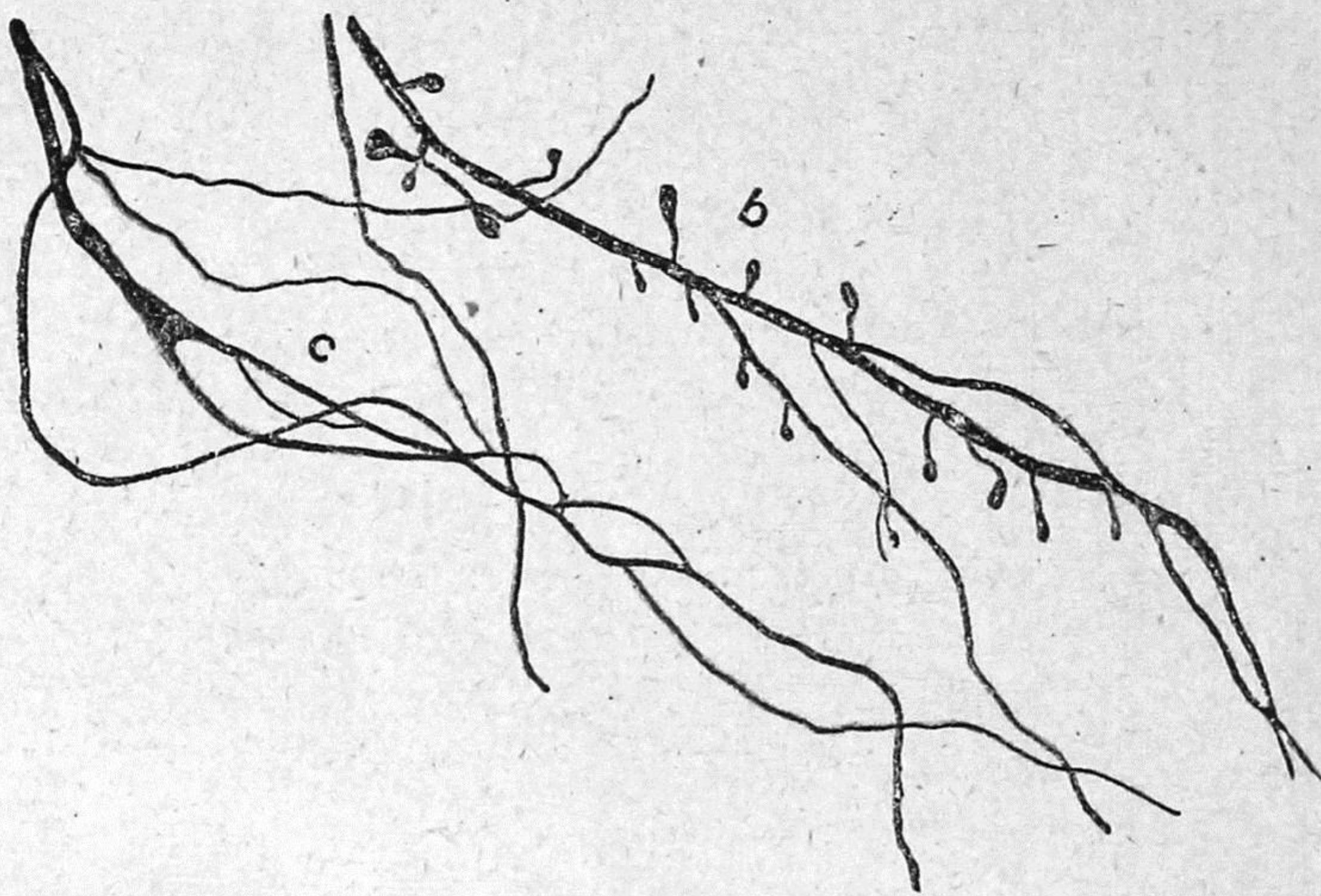


FIG. 33 - Plessi e reti fortemente ingrandite di fibre cresciute nel coagulo in una coltura conservata al 3° giorno di vita, di rombencefalo di embrione di pollo al 3° giorno. Ingr. 1650 (da LEVI).

di cellule, indipendenti od unite in una membrana sinciziale, ma con caratteri istologici e rapporti reciproci diversi da quelli che avevano nell'organismo.

Ed è singolare, che sovente anche altre cellule, elementi muscolari del miocardio dell'embrione, cellule epiteliali o ghiandolari, divengono pur esse migranti, si portano nel coagulo e perdono la loro impronta, al punto che possono essere confuse coi fibroblasti.

Fibroblasti ed altre cellule sdifferenziate acquistano nel nuovo ambiente il potere di moltiplicarsi altrettanto attivamente, e forse più, degli elementi del germe nei più precoci periodi dell'ontogenesi.

Sdifferenziazione e mitosi sarebbero, secondo Champy, la conseguenza di un unico fenomeno iniziale: la preponderanza della funzione vegetativa del protoplasma su quella specifica.

2° Altre volte la sdifferenziazione degli elementi di alcuni tessuti è di minor grado o manca. Gli elementi epiteliali talora si estendono nel coagulo mantenendo le connessioni vicendevoli che avevano nel tessuto. Il miocardio può affacciarsi nella zona d'invasione in forma di un sincizio plessiforme, con manifeste miofibrille trasversalmente striate; così i muscoli scheletrici.

3° Una terza eventualità si può verificare per alcuni tessuti coltivati in vitro, la differenziazione. Se il tessuto fu espiantato da embrioni in periodi precoci dello sviluppo, quando il medesimo non possedeva la propria impronta, i suoi elementi possono evolversi in modo simile a quello che sarebbe avvenuto se il tessuto fosse rimasto a far parte dell'embrione.

Questo si verifica per il tessuto nervoso; la formazione delle fibre nervose da neuroblasti, come pure il loro accrescimento in lunghezza, rappresenta un processo di differenziazione, il quale si discosta da quello che si svolge nell'embrione in alcuni particolari, ma non nei caratteri essenziali.

Certamente il risultato definitivo dell'attività formativa dei neuroblasti è ben diverso che nell'embrione; si forma nel coagulo un intreccio, od un plesso, od una rete di fibre nervose, ma neppur il più lontano ricordo ritroviamo della struttura della regione dei centri nervosi, alla quale i neuroblasti appartengono.

O con altre parole è indiscutibile, che i singoli elementi nervosi possono differenziarsi in vitro, ma l'intreccio caotico di fibre nervose che si costituisce nel coagulo non ha veruna analogia col tessuto originario.

Anche gli elementi muscolari dei miotomo sono suscettibili in casi singoli di differenziarsi nelle colture in vitro (Harrison).

Inoltre Shypley in colture di embrioni di pollo, espantati prima che il cuore pulsasse, ha visto insorgere contrazioni

ritmiche in quest'organo, il quale si era nel frattempo sviluppato.

Sulle cause della sdifferenziazione dei tessuti nelle colture furono formulate interpretazioni divergenti.

Se nelle colture in vitro i caratteri specifici del tessuto possono a vicenda mantenersi o scomparire, evidentemente la sdifferenziazione non può essere una conseguenza inevitabile dell'esser stato il frammento di tessuto sottratto all'influenza regolatrice esercitata dal tutto sulle parti. Champy attribuì la scomparsa delle strutture specifiche nelle cellule cresciute nell'espianto, all'assenza di stimoli funzionali nelle colture; ma questa supposizione non spiega come in molte colture, nelle quali pure quegli stimoli mancano, la sdifferenziazione non avviene.

E la medesima ancor meno si accorda colle variazioni nella persistenza dei caratteri tipici, in rapporto alle diverse proprietà del mezzo di coltura, le quali evidentemente non possono influire sull'esplicarsi o meno degli stimoli funzionali specifici.

Il vario spessore dello strato di plasma, la sua densità, ed altri fattori contribuiscono a determinare una sdifferenziazione più o meno elevata.

Quando gli elementi della zona d'invasione, per l'acidità del mezzo e per la sottigliezza del coagulo, assorbono una gran quantità d'acqua e si distendono in una lamina sottilissima, manifestano una più vivace attività di locomozione, si riproducono più di sovente, e perdono i caratteri specifici; l'opposto avviene invece quando lo strato di plasma è più grosso (G. Levi).

Tutto ciò prova, che la sdifferenziazione delle cellule nelle colture, quando avviene, dipende, almeno in parte, da cause fisiche inerenti al mezzo, che agiscono direttamente sulla cellula determinandone il mutamento di forma e di struttura.

RIASSUNTO

Nelle colture gli elementi emigrati del coagulo non ripetono mai l'architettura tipica dell'organo da cui provengono, anche se hanno mantenuti i caratteri specifici originari, oppure se essi li hanno acquistati differenziandosi nella coltura.

Cosicchè la tecnica di Harrison attualmente non ci permette mai di coltivare un organo, bensì un tessuto.

Nelle colture a rapido accrescimento, di cui il miglior esempio è dato da quelle di fibroblasti, le cellule della zona d'invasione sono elementi sdifferenziati, i quali hanno cioè perduto i caratteri specifici, ed hanno invece acquistato la proprietà di migrare e di accrescersi velocemente.

Ma talvolta tessuti specificamente differenziati possono emigrare nella zona d'invasione, conservando i propri caratteri e talora anche differenziandosi: così gli epiteli, gli elementi muscolari striati del cuore e dei muscoli scheletrici, le cellule muscolari lisce.

In queste colture di elementi con caratteri specifici, l'accrescimento è sempre meno vivace che nelle altre cellule sdifferenziate, e non di rado manca del tutto.

Notevole è la proprietà di pulsare ritmicamente, che gli elementi muscolari lisci e striati emigrati nella coltura manifestano. I neuroblasti dell'espianto si differenziano nella coltura emettendo per movimento ameboide un prolungamento destinato a divenire una fibra nervosa, ma la parte nucleata del neuroblasta non abbandona l'espianto.

Il grado della sdifferenziazione del tessuto coltivato dipende in gran parte dalle proprietà del mezzo; quando queste sono tali da determinare un'elevata imbibizione delle cellule, esse perdono del tutto i caratteri di specificità.

CAP. VI.

Problemi di morfologia e di fisiologia generale accessibili al metodo delle colture dei tessuti in vitro.

La prova raggiunta negli ultimi anni della possibilità di accrescimento dei tessuti isolati dall'organismo, per quanto costituisca un fatto interessante, non è una scoperta che modifichi in modo sostanziale le vedute finora dominanti sulla vita dei tessuti e delle cellule. Ma il suo valore è invece grandissimo, in quanto rappresenta un nuovo metodo di studio, il quale ci permette di approfondire la conoscenza dei processi elementari morfologici e funzionali delle cellule e dei tessuti mentre vivono e si accrescono. Con questo mezzo noi possiamo sottrarle all'influenza degli ormoni circolanti e del sistema nervoso, cioè delle cause che stabiliscono intime correlazioni fisiologiche fra gli organi e perciò modificano le funzioni elementari delle cellule.

E questo metodo in pochi anni, ha dato moltissimo alla scienza e non è certo ancora esaurito.

Sarebbe però erroneo supporre, che esso sia un mezzo di indagine diretto dei fenomeni biologici elementari degli organismi, quale sarebbe l'osservazione dei movimenti in un'ameba mantenuta nel suo ambiente naturale.

Noi sappiamo, che col metodo di Harrison si allevano artificialmente dei tessuti, i quali son sempre differenti, per quanto in vario grado, da quelli dell'organismo.

Per adattamento al nuovo ambiente, la costituzione tipica dell'organo viene ad essere modificata; e così pure diverse divengono le attività vitali dei tessuti.

Questo metodo ha adunque per la Biologia dei tessuti un valore paragonabile a quello che ha l'Embriologia sperimen-

tale per la soluzione dei problemi attinenti all'ontogenesi normale. E' noto, che, se coll'eliminazione di parti del germe e con trapianti noi perturbiamo lo sviluppo normale, la conoscenza dello sviluppo anomalo che ne deriva e delle regolazioni successive, ci concede di trarre delle induzioni sui fattori causali dello sviluppo.

Allo stesso modo, se si coltivano dei tessuti in mezzi di cui modifichiamo le proprietà fisiche e chimiche con esattezza incomparabilmente più grande di quel che sia possibile quando sperimentiamo nell'organismo mantenuto nella sua integrità, nonostante le profonde modificazioni che avvengono nelle colture, lo studio di queste rende palesi molti fatti attinenti alla biologia dei tessuti degli organismi, che fino ad oggi rimanevano avvolti in un fitto velo.

Noi daremo in questo Capitolo qualche cenno sui principali problemi, che il metodo delle colture ha permesso, se non di risolvere, di approfondire, certamente molto più di quanto fosse stato fatto in passato.

1. *Struttura del protoplasma.*

Lo studio di questo problema ha appassionato i cultori di Citologia sin dai primordi della dottrina cellulare, ma i risultati non furono sempre adeguati al grande sforzo compiuto.

L'immensa maggioranza degli studiosi si dedicava alla analisi microscopica dei tessuti, nei quali le sostanze proteiche erano state precipitate da soluzioni di sali di metalli pesanti, di acidi organici od inorganici ecc.; la composizione di queste soluzioni era stata scelta per via empirica; e quasi sempre difettavano criterî atti a stabilire, se le immagini ottenute nei tessuti sottoposti e manualità tecniche complicate, trovavano il loro riscontro nel vivente. Vere eccezioni rappresentano osservazioni singole compiute, soprattutto dai grandi istologi del secolo scorso, su Protisti, su cellule vegetali e su alcune cellule animali, che per il grande volume e la maggior trasparenza si prestavano ad essere esaminate direttamente al microscopio senza il sussidio di manipolazioni tecniche, nè di processi di colorazione.

Se le indagini sulle cellule viventi dei tessuti di Metazoi

furono fino a poco tempo fa così scarse, ciò dipende dalle difficoltà insuperabili, che un'analisi ottica minuta coi più forti ingrandimenti sulle cellule viventi, presenta.

Infatti se si isolano completamente le cellule di un tessuto, esse non sopravvivono a lungo (pag. 12); d'altro canto quando le cellule sono sovrapposte in più strati, veruna osservazione minuta nelle medesime è possibile.

Ed ad ogni modo anche nelle cellule isolate il protoplasma

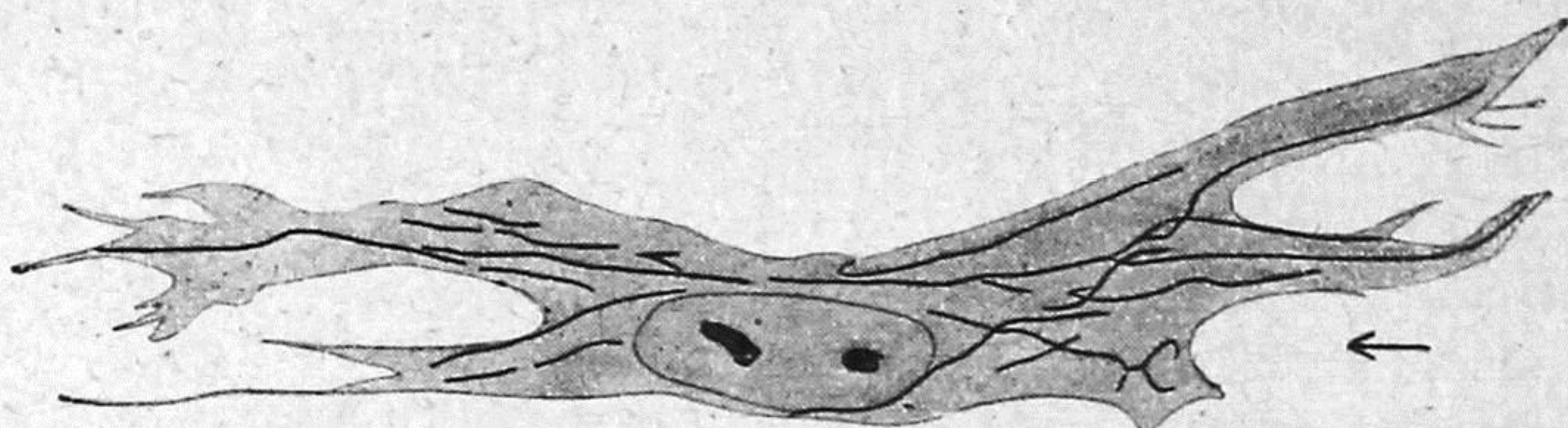


FIG. 34 - Fibroblasta a forma allungata con propaggini di locomozione e lunghi condrioconti diretti parallelamente all'asse. Ingr. 600 (da LEVI).

si presenta opaco, e le particelle in esse contenute sono addensate al punto, che esse a stento ed in casi eccezionali sono otticamente analizzabili.

Il metodo delle colture in vitro ci preparò una sorpresa nella conoscenza della costituzione del protoplasma delle cellule viventi.

Studiando le cellule aderenti al vetrino e distese in tenuissime lamine in colture in liquido di Locke, oppure in colture in uno strato sottilissimo di plasma, in grazia all'estrema sottigliezza che viene ad acquistare la cellula, l'intima costituzione del protoplasma e del nucleo si svela all'osservatore con una chiarezza mirabile.

G. Levi estendendo le osservazioni antecedenti di W. ed M. Lewis, dimostrò per questa via, che il citoplasma degli elementi della zona d'invasione nella sua parte principale è costituito da un colloide liquido, trasparente ed omogeneo, da un sol, nel quale sono sospese delle particelle gelificate più refrangenti, in forma di filamenti di varia lunghezza, più di rado di minuti granuli; questi si spostano continuamente, e con vivacità tanto maggiore, quanto più attiva è l'emis-

sione di propaggini da parte delle cellule; il che si spiega tenendo conto, che la rapidità delle correnti di liquido intracellulari, le quali ne determinano lo spostamento, è in rapporto diretto colla vivacità del movimento protoplasmatico. Inoltre essi cambiano di forma, si riuniscono in filamenti più lunghi, i quali alla lor volta si frammentano (vedi fig. 5-7, 34).

Nessun dubbio, che queste formazioni corrispondono a quegli organi della cellula, costituiti in parte da lipoidi fosforati, conosciuti da molto tempo come mitocondri, e che venivano indicati nella moderna nomenclatura citologica col nome di condriosomi; i medesimi erano stato oggetto di tante indagini, in maggioranza poco conclusive; molto si era discusso sul loro significato, sui loro rapporti col rimanente del citoplasma e perfino sulla loro reale esistenza, che da molti, anche autorevoli citologi, era stata anche di recente posta in dubbio, perchè ritenuti artefatti dipendenti dalla conservazione dei tessuti.

Ma il fatto nuovo più importante, che lo studio minuzioso di singole cellule coltivate ha posto in evidenza, è la grande variabilità nel numero e nella forma dei condriosomi, come pure nella loro massa complessiva in una stessa cellula durante le varie fasi della sua attività; il che lascia supporre, che fra il colloide nella fase liquida ed il colloide gelificato deve prodursi in un attivo scambio d'acqua e di altre sostanze, il quale è accompagnato da mutamenti nello stato fisico dei colloidi.

Cosicchè oggi non è più ammissibile, come era stato supposto in passato, che i condriosomi siano organi della cellula a forma determinata ed invariabile, ma almeno nelle cellule migranti delle colture questa muta continuamente.

Certo sarebbe erroneo il ricondurre senz'altro i fatti attinenti alla struttura del citoplasma, osservati nelle cellule coltivate in vitro, agli elementi dell'organismo, specialmente se differenziati in rapporto a funzioni specifiche. Infatti abbiamo ragione di ritenere, che, per lo meno in molti di questi, la parte fondamentale omogenea del citoplasma è gelificata, e che i condriosomi ed i granuli in essa inclusi sono perciò immobili.

L'imbibizione relevantissima, a cui sottostanno le cellule

quando emigrano nella zona d' invasione, determinerebbe un mutamento di fase del gel che costituisce la parte fondamentale del citoplasma; quando il gel diviene liquido, si trasforma cioè in sol, le cellule acquistano la capacità di emettere delle propaggini e di migrare (G. Levi).

Molti altri fatti attinenti all' intima struttura del citoplasma, sui quali non mi è concesso di soffermarmi, furono illustrati negli ultimi anni con questo metodo; l' impiego di sostanze coloranti poco tossiche (Rosso neutro, Tripanblau, Bléu Pirrolo ecc.) ha permesso di apprezzare in alcune cellule l' esistenza di granulazioni intracellulari, che sono in rapporto coll' attività metabolica del citoplasma; e per lo meno alcune di queste non hanno niente di comune coi condriosomi, i quali invece sono organi tipici per ogni protoplasma vivente.

La reale esistenza della centrosfera fu provata in modo inoppugnabile nelle cellule coltivate in vitro (W. Lewis, Macklin): è un gel lievemente concentrato, di fronte al citoplasma circostante, contenente due centrioli. La forma della centrosfera subisce continuamente dei mutamenti, che sono collegati a quelli dei mitocondri adiacenti.

2. *Il processo di divisione nelle cellule coltivate in vitro.*

Lo svolgimento della divisione cellulare mitotica non era stato prima d' ora quasi mai seguito in cellule somatiche viventi di Metazoi; prima della scoperta del metodo delle colture, le osservazioni finora erano limitate a uova molto trasparenti (di Echinodermi).

Nella zona d' invasione di qualsiasi coltura in vitro vivente è facilissimo seguire in tutte le sue fasi il decorso della mitosi.

A parità di temperatura il processo dura in colture di tessuti di embrioni di pollo da un massimo di 40 minuti ad un minimo di 16; per lo più si svolge velocemente, in 18-20 minuti.

Si potrebbe supporre, che nelle colture ad accrescimento molto rapido la mitosi si svolgesse più velocemente; invece questo non si verifica; la percentuale degli elementi in divisione di fronte a quelli in riposo è di molto più elevata nel-

l'unità di tempo, che nelle colture più torpide, ma la loro velocità non è aumentata (Levi).

Questo permette di concludere, *che la velocità di accrescimento di una coltura (e forse anche dei tessuti di un organismo) dipende da un incalzare più rapido delle divisioni cellulari e non da un'accelerazione del loro ritmo.*

Inoltre interessanti fatti furono osservati da Burrows e da G. Levi durante l'anafase e la telofase della mitosi, i quali permettono di avanzare qualche nuova supposizione sui fattori fisici di questo processo.

Non appena si inizia lo strozzamento equatoriale della cellula, si osserva in vari punti della superficie un'emissione tumultuaria di gemme protoplasmatiche trasparenti, che ricorda un movimento ameboide molto veloce.

Quando lo strozzamento è completo, l'emissione di gemme raggiunge il massimo e si protrae per qualche minuto dopo.

Questo fenomeno singolare sarebbe suscettibile dell'interpretazione seguente:

Durante le prime fasi della mitosi si stabilisce una tensione superficiale relevantissima, per effetto della quale la cellula ritira le sue propaggini e diviene sferica. Durante l'anafase la tensione superficiale si mantiene elevata solamente all'equatore, diminuisce moltissimo, per fattori endocellulari d'ordine fisico-chimico, in singoli punti della superficie, ove, per effetto di questa diminuzione, sono emesse le gemme ameboidi; dallo squilibrio fra la tensione nelle varie regioni dipenderebbe lo strozzamento equatoriale (Burrows, G. Levi).

La divisione nucleare diretta è frequente nelle colture in vitro, ed avviene in cellule in tutto e per tutto normali (Macklin); il processo decorre lentamente, e solamente alla fine, durante la costrizione nucleare, diviene veloce; non è mai seguita nelle cellule da divisione del citoplasma, cosicchè si costituiscono elementi binucleati.

Queste interessanti ricerche di Macklin provano adunque, che l'amitosi non è un mezzo di divisione cellulare completa, ma rappresenta solamente un mutamento di forma del nucleo.

Ciò è convalidato dal comportamento delle cellule binucleate quando si riproducono per mitosi tipica; allora due gomitoli distinti appaiono nei due nuclei, ma essi si riuniscono

in un' unica placca equatoriale; da quel momento la mitosi procede in modo tipico e conduce alla formazione di due cellule distinte unicleate. Invece non avviene mai una fusione di due nuclei senza mitosi.

Sicchè una sola ricerca compiuta con questo mirabile metodo d' indagine, ci ha condotto più lungi nell' interpretazione della divisione diretta, che il lavoro, coronato da così scarso risultato, di tanti pur valenti studiosi!

3. *Contributo che il metodo delle colture « in vitro » ha portato al problema dell' accrescimento.*

Ho detto, che nelle colture la velocità di accrescimento delle cellule è incomparabilmente superiore a quella che le medesime avevano nell' organismo, ma non abbiamo tenuto conto fin qui, nel considerare tale velocità, dello stadio di sviluppo a cui si trova l' embrione, di cui il tessuto fu espianato.

Importanti ricerche compiute nell' accrescimento di moltissimi animali hanno provato, che a partire dalle prime fasi dello sviluppo embrionario, l' aumento ponderale relativo dell' organismo in via di sviluppo, decresce rapidamente; nella specie umana ed in molte altre, la curva della velocità di accrescimento corrisponde esattamente ad una parabola. L' espressione strutturale di questo fenomeno è un progressivo rallentamento delle divisioni degli elementi costitutivi degli organi.

Ebbene, visto che le cellule degli organi hanno un' energia di accrescimento gradatamente decrescente, quanto più progredisce lo sviluppo, sarebbe prevedibile, che l' attività riproduttiva degli elementi di un espianto fosse tanto meno vivace, quanto più inoltrato è l' embrione.

Ma tale previsione non è convalidata dall' esperienza. La attività di una coltura è affatto indipendente dal grado di sviluppo del' embrione; organi di pulcini al 17° giorno di incubazione danno colture altrettanto attive, che embrioni al 2° giorno.

✕ | Gli elementi del rene adulto, che hanno perduta nell' organismo la proprietà di dividersi, la acquistano nella coltura, non appena si sono sdifferenziati (Champy).

Inoltre gli interessantissimi risultati ottenuti da Carrel e da Ebeling (pag. 52) col metodo delle seminagioni in serie provano, che l'energia di accrescimento degli elementi « in vitro » è inesauribile; dopo 7 anni la velocità di accrescimento di una coltura si palesò altrettanto grande di quello che era 5 anni prima.

Se in quelle esperienze tutto il tessuto ottenuto con trapianti successivi fosse stato utilizzato per l'allestimento di nuove colture, si sarebbero avute nel periodo di 10 anni colture a miliardi, una massa gigantesca di sostanza vivente, che non ha il suo riscontro in alcun organismo.

Eppure quelle stesse cellule, se fossero invece rimaste a far parte dell'organismo, avrebbero dato origine ad una quantità di tessuto limitata; esse si sarebbero divise ad intervalli sempre più lunghi, finchè il loro accrescimento si sarebbe arrestato.

Viene con ciò provato, che la limitazione nell'accrescimento degli animali non dipende da fattori insiti alle cellule, ma da altre cause, che probabilmente sono le stesse, che regolano la forma e l'architettura degli organi; hanno certamente importanza gli ormoni, mediante i quali si stabiliscono le correlazioni nell'accrescimento di vari organi ⁽¹⁾.

Inoltre è possibile che, come suppone Champy, in un organo la moltiplicazione cellulare sia inibita dalle influenze reciproche esercitate da un tessuto sull'altro, le quali si interferiscono.

Quando le cellule sono sottratte coll'espanto all'azione dei fattori, che ne limitano l'attività di riproduzione, questa si ridesta e prosegue senza limiti.

Dimodochè le cellule di quei tessuti, per cui fu dimostrato un accrescimento illimitato nelle colture in vitro, come gli elementi dei neoplasmi maligni e gli elementi sessuali, sono potenzialmente immortali.

E ciò convalida il concetto oggi dominante, che la sene-

⁽¹⁾ Le recenti interessanti osservazioni di Carrel ed Ebeling, che il plasma ed il siero di animali di età avanzata inibisce l'accrescimento delle colture « in vitro » in confronto al siero di animali giovani (pag. 41) provano in modo decisivo, che l'accrescimento dei tessuti di un organismo è regolato da fattori estrinseci alle cellule.

scenza e la morte di un organismo non dipendono dalla senescenza e dalla morte di tutti i suoi elementi costitutivi, ma solamente di alcuni, probabilmente i più altamente differenziati.

4. *Contrazioni ritmiche degli elementi muscolari coltivati in vitro ed importanza di tale fatto per la dottrina miogena della contrazione muscolare.*

Burrows ha constatata la pulsazione ritmica nel sincizio sviluppatosi in colture di miocardio di embrione di pollo ed anche di cellule isolate.

Negli elementi pulsanti isolati, il ritmo dei quali non è sempre sincrono a quello del sincizio (pag. 57), la fase di contrazione dura più a lungo di quella di rilassamento; questa ultima ricorda il rimbalzo di un tubo di gomma teso, e probabilmente vi influisce l'elasticità dei filamenti di fibrina, ai quali le cellule s'inseriscono colla loro estremità assotigliata.

La cellula si accorcia di $\frac{1}{5}$ durante la contrazione, ed il suo diametro aumenta apparentemente in tutti i punti. L'intervallo fra due fasi è breve.

M. Lewis ha pure notato che, la contrazione delle cellule del miocardio isolate è caratterizzata da accorciamento e da ispessimento delle medesime (fig. 35) congiunti ad un lieve movimento pendolare, coi caratteri di un battito. E sebbene esse pulsassero col ritmo di 115 contrazioni al minuto, emettevano contemporaneamente molte propaggini.

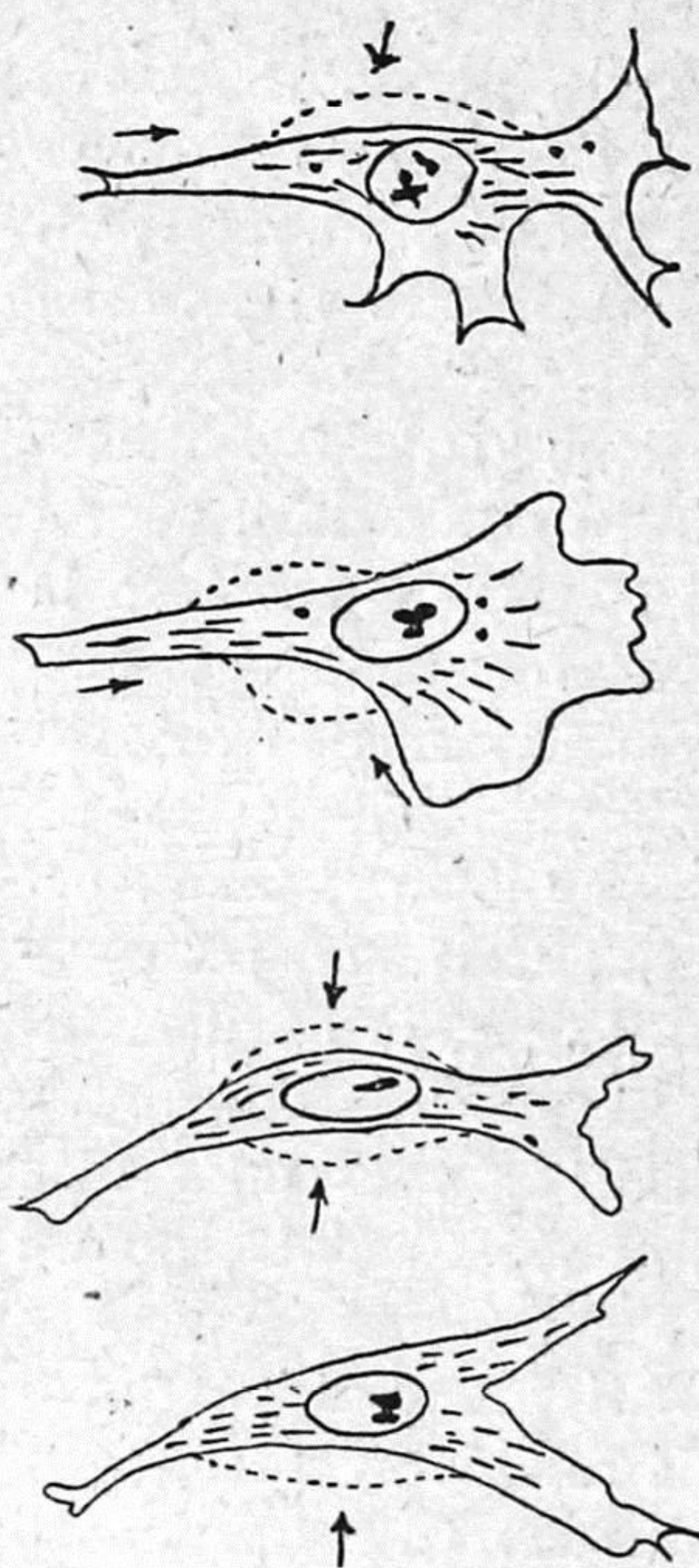


FIG. 35 - Modificazioni di forma di una cellula muscolare del cuore, la quale si contraeva ritmicamente (115 pulsazioni al minuto), disegnata ad intervalli di 15 minuti: durante la fase di contrazione la cellula ha il contorno che è indicato dalla linea punteggiata (da M. LEWIS).

Le cellule erano refrangenti, senza miofibrille, con mitocondri ed altri granuli.

E' difficile immaginare una riprova più convincente, di quella desunta dalla pulsazione di elementi muscolari isolati, dell'esattezza della dottrina miogena della contrazione muscolare esposta da Gaskell e convalidata dalle ricerche di Fano, di Bottazzi e di altri ⁽¹⁾.

Negli elementi pulsanti del cuore e dei muscoli volontari mancano adunque i caratteri specifici delle fibre muscolari striate, segnati dalla presenza di miofibrille trasversalmente striate, caratteri che pure si riscontrano in varie colture di tessuto muscolare. Ciò proverebbe, che la differenziazione funzionale e morfologica non sono in un rapporto di dipendenza così intimo, come si ritiene generalmente; il che del resto è anche provato dallo stabilirsi delle pulsazioni ritmiche nel cuore dell'embrione di pollo alla 36^a ora, quando la differenziazione delle miofibrille è a stento iniziata.

Certo questo particolare, importante per la conoscenza del fondamento strutturale della contrazione muscolare, dovrebbe essere svolto ulteriormente.

5° - *Conquiste nel campo dell'istologia del sistema nervoso.*

Da lunghi anni si trascinava il dibattito, se ciascuna fibra nervosa si sviluppa, come riteneva His, da un neuroblasta, senza partecipazione di altri elementi, oppure se esse si differenziano da catene di cellule satelliti emigrate dai centri nervosi; od infine, come le recenti ricerche di Held, compiute coi più moderni metodi tecnici tendevano a dimostrare, se le fibre cresciute come prolungamenti dei neuroblasti seguono la via tracciata dalle cellule dei tessuti e dalle connessioni plasmatiche intercellulari.

(1) Quest'argomento in favore della dottrina miogena dell'impulso cardiaco è invero superfluo per chi abbia qualche cognizione di Embriologia. Infatti il cuore di embrione di pollo pulsa anche isolato sin dalla 33^a ora d'incubazione, quando non è neppure lontanamente concepibile l'esistenza di elementi nervosi intracardiaci, visto che in quel periodo non si è ancora iniziata la differenziazione delle neurofibrille nel sistema nervoso centrale.

La prova data da Harrison, che le fibre nervose crescono liberamente in un coagulo privo di cellule, per attività esclusiva di un neuroblasta, ha confermato in modo inoppugnabile e decisivo la dottrina di His.

Inoltre il metodo delle colture ha portato un notevole contributo al problema dei rapporti reciproci fra elementi nervosi. I seguaci della dottrina del neurone affermano, che le espansioni di una cellula nervosa hanno rapporti solamente di contiguità e non di continuità materiale con elementi vicini, mentre secondo altri, pur autorevoli ricercatori, il tessuto nervoso è costituito da una rete inestricabile di fibrille e di fibre, nelle quali non ci è concesso di rintracciare delle individualità distinte. Nonostante numerosissime e pazienti ricerche, una soluzione nell'uno e nell'altro senso non è stata ancora data, ed è poco probabile che per le vie fino ad oggi seguite vi si arrivi.

Quanto fu riferito nel precedente Capitolo, desunto dallo studio delle colture viventi, prova in modo decisivo, che, per lo meno nelle colture, si può stabilire una vera e propria anastomosi fra due fibre distinte (pag. 62 e seg.).

Però il fatto di G. Levi illustrato, che le anastomosi fra le fibre non sono sempre permanenti, lascia supporre, che anche quando l'individualità anatomica dei neuroni apparentemente scompare, il protoplasma nervoso rappresentato dal neurite e dalle collaterali, il quale si trova sotto la dipendenza del neuroblasta, per oscure affinità biologiche mantenga con quest'ultimo rapporti funzionali più intimi, che con neuroni vicini; così si spiegherebbe come qualche neurone possa talora rendersi indipendente.

Dimodochè quando in una coltura, e forse anche nel sistema nervoso, si costituisce una complicata rete di fibre proveniente da neuroni distinti, questi possono conservare un certo grado di individualità, la quale si manifesta talora per la proprietà che essi possiedono di divenire indipendenti.

Anche alla conoscenza dell'intima struttura dei neuroni le ricerche sulle colture viventi hanno portato un contributo, che, se sarà ulteriormente svolto, potrà forse divenire di importanza grande.

Con speciali metodi di colorazione fu da molti anni pro-

vata l' esistenza nelle cellule e fibre nervose di filamenti esilissimi, le neurofibrille, dotate di speciali proprietà microchimiche, che nel corpo cellulare si anatomizzano a rete.

Esse per la loro estrema tenuità, e perchè fittamente addensate, non sono visibili nè nelle cellule, nè nelle fibre nervose viventi.

Per questo, ed anche per le grandi variazioni di forma che presentano, a seconda del metodo di colorazione istologica adoperato, molto si è discusso sulla loro disposizione, e persino si sollevò qualche dubbio sulla loro preesistenza negli elementi nervosi viventi.

In colture di tessuto nervoso si distingue nelle fibre viventi una fine striatura longitudinale, ma non una struttura fibrillare vera e propria; però quando esse si espandono sul vetrino in sottili lamine, le fibrille si dissociano alquanto e divengono manifeste (G. Levi).

Ma dai fatti osservati nel seguire le trasformazioni nell'intima struttura delle fibre in via di sviluppo, non sembra che, come si riteneva finora, le neurofibrille siano sempre ben individualizzate, ma appaiono mutevolissime; talora esse si risolvono in fibrille più sottili, a stento visibili, oppure si confondono in una lamina protoplasmatica omogenea, nella quale più tardi si rende di nuovo manifesta una struttura fibrillare. Le trasformazioni delle neurofibrille, come quelle dei condriosomi (pag. 73) sarebbero adunque reversibili.

6° - *Persistenza dell' individualità cellulare nei sincizi.*

La dottrina cellulare, nei termini nei quali era stata formulata dai suoi fondatori, presupponeva, che tutti i tessuti fossero costituiti da unità distinte ed indipendenti.

Più tardi questa concezione venne modificata; si dimostrò per molti tessuti una costituzione che fu chiamata sinciziale, cioè la presenza di connessioni plasmatiche, talora estese al punto, che l' individualità delle singole cellule appare poco manifesta.

Ed alcuni citologi (Rohde, Schlater, ecc.) attribuendo una importanza, che io ritengo esagerata, a tali reperti sulla costi-

tuzione sinciziale dei tessuti, espressero l'avviso, che il fondamento morfologico della dottrina cellulare fosse scosso.

Ora i fatti che appaiono seguendo la vita di una coltura, pongono il problema della costituzione sinciziale dei tessuti sotto una nuova luce.

Sebbene il tessuto di sostegno (mesenchima) abbia una manifesta costituzione sinciziale, se esso vien coltivato, dall'espianto si liberano delle cellule che emigrano isolate nel coagulo, oppure si anastomizzano con altre vicine; in tal caso si costituisce un nuovo sincizio nel coagulo; ma spesso le connessioni si scindono, le cellule si liberano e procedono oltre. Così pure in colture di tessuto nervoso le anastomosi che si istituiscono tra fibre di neuroni distinti sono talora temporanee (pag. 80); le fibre dapprima riunite si separano e continuano a crescere isolate.

Parimenti nel miocardio dell'embrione di pollo dal 3° giorno al 12° d'incubazione, finchè fa parte dell'embrione, non sono appariscenti i limiti cellulari, ed è percorso in tutta la sua estensione da lunghe miofibrille trasversalmente striate. Ebbene, quando un frammento di questo tessuto viene espantato in plasma, dal medesimo emigrano nel coagulo degli elementi a forma lamellare, nettamente individualizzati, i quali dapprima sono fra loro uniti mediante ponti protoplasmatici, percorsi da qualche miofibrilla, ma ben tosto si liberano dalle loro mutue connessioni; e nella parte più distale della zona d'invasione si vedono mioblasti isolati, che per i loro movimenti attivi sempre più si allontanano dall'espianto.

Tuttociò prova, che *anche nei tessuti nei quali coi metodi d'indagine istologica non appare una costituzione cellulare, ciascun nucleo deve esercitare un'influenza regolatrice sovra una zona di protoplasma di grandezza costante, la quale ha in speciali condizioni il potere di acquistare un'individualità, separandosi assieme al nucleo dal sincizio. O con altre parole, anche nei tessuti, nei quali l'individualità morfologica delle cellule sembra scomparsa, o lo è realmente, questa esiste in potenza.*

Il liberarsi delle cellule dal sincizio deve essere interpretato come un distacco di unità distinte, per quanto intimamente aderenti, oppure dipende da vere discontinuità che si

stabiliscono nei ponti protoplasmatici che uniscono le cellule l'una all'altra?

W. Lewis ritiene, che nel mesenchima si abbia semplicemente aderenza fra le propaggini cellulari e non continuità materiale. La prova decisiva della continuità sarebbe raggiunta quando si dimostrasse, che attraverso le connessioni plasmatiche fra cellule distinte passano, trascinate da correnti di liquido, particelle sospese.

W. Lewis in passato credeva di aver osservato in colture di mesenchima il passaggio di mitocondri da un'unità all'altra, ma più di recente si è rieduto.

Ma ad ogni modo, anche se si ammette una continuità materiale fra cellule o fibre distinte, che in alcune colture (di fibre nervose ad es.) ed in vari tessuti (nel miocardio) non può essere posta in dubbio, resta il fatto importante, che questa continuità non cancella mai l'individualità biologica della massa di citoplasma, che si trova sotto la dipendenza di ciascun nucleo.

Il che però non implica un ritorno alle antiche idee, che un Metazoo rappresenti un'associazione di organismi elementari, le cellule (ipotesi dello stato cellulare, pag. 1 e 2). Abbiamo o no tutti i tessuti, o solamente alcuni, una struttura sinciziale, ciò ha importanza accessoria per il principio dell'unità funzionale dell'organismo, che è saldamente edificato sui fatti provati dalle ricerche di Embriologia sperimentale.

E tale principio non è certo intaccato dalla prova, che io ritengo raggiunta, di una certa autonomia dei costituenti elementari dei tessuti, la quale si manifesta anche quando coi comuni metodi d'indagine essa non risulta.

CAP. VII.

Influenza dell'ambiente sulla biologia dei tessuti coltivati. - Applicazioni del metodo delle colture alla patologia della cellula e dei tessuti.

1. Modificazioni nell'attività e nei caratteri delle colture per variazioni dell'ambiente.

Finchè un tessuto fa parte dell'organismo, non ci è concesso di modificare l'ambiente nel quale esso vive, senza un perturbamento nelle condizioni del tutto; ed anche supponendo che ciò fosse realizzabile, non riusciamo neppure ad intravedere come potremmo studiarne le conseguenze.

Il metodo delle colture ci dà il mezzo di saggiare con precisione l'influenza di variazioni del mezzo ambiente sui singoli tessuti; l'indirizzo dovrà essere lo stesso, che fu seguito con tanto successo nello studio della Biologia dei Protisti e delle uova durante le primissime fasi dello sviluppo.

Quanto le colture siano sensibili alle variazioni nelle proprietà del mezzo, fu detto nel Cap. III; particolarmente appariscente è l'influenza dello spessore del coagulo e della densità del plasma sulla velocità di accrescimento della coltura (pag. 40 e seg.); però in queste esperienze non ci è dato di determinare con esattezza come le suddette modificazioni nell'ambiente agiscano sulla coltura.

Sembra che la diluizione del plasma non abbia influenza sul numero delle mitosi (Lambert); cosicchè l'accrescimento più attivo della coltura non può dipendere che dal numero più rilevante delle cellule emigrate nel plasma; queste troverebbero in un coagulo più lasso minori ostacoli sul loro cammino.

L'influenza della diluizione del plasma non è la medesima

su tutte le cellule; è sensibile su elementi molto mobili (del midollo osseo e della milza), minore su quello del tessuto di sostegno; le cellule con limitato potere di migrazione (epiteli) non risentono effetto veruno della diluizione del mezzo.

W. Lewis ed i suoi collaboratori hanno analizzata l'azione sulle cellule in vitro di fattori fisici e chimici più esattamente definibili, di quel che sia la diluizione e lo spessore del plasma; pressione osmotica, varia concentrazione di elettroliti del mezzo, presenza di sostanze ossidanti, di glucosio, di glicerina, di albume d'uovo ecc. E questo fu fatto su colture in liquido di Locke, cioè in un mezzo che essendo di composizione chimica esattamente conosciuta, si prestava meglio del plasma per queste ricerche; a volte la costituzione del mezzo veniva modificata quando la coltura era già sviluppata, oppure sin dal momento dell'espianto.

I risultati ottenuti fino ad oggi non permettono di trarre da queste esperienze conclusioni d'indole generale; ma certamente quest'indirizzo è promettente.

La mancanza di glucosio dal liquido di Locke, in cui le cellule si vanno sviluppando, è dannosa; porta abbastanza presto alla vacuolizzazione ed alla morte delle cellule; l'aggiunta di piccole quantità (0,5 %) ne prolunga la vita, mentre la presenza di grandi quantità di quella sostanza (2,5 %) impedisce la vacuolizzazione del citoplasma, ma producendo acidificazione nel mezzo conduce rapidamente le cellule alla morte.

La presenza di albume d'uovo è molto dannosa, determinando la formazione nel citoplasma di grossi granuli.

L'aggiunta di glicerina al mezzo in colture di cellule muscolari produce una retrazione delle propaggini delle cellule.

Un certo grado di acidità (corrispondente a 0,02 % di bicarbonato sodico) si palesò utile all'accrescimento della coltura; un'acidità superiore od inferiore apparve dannosa; al di là di un certo limite l'accrescimento si arrestava (W. Lewis).

Alcune sostanze coloranti (il Rosso neutro e il verde Janus), essendo pochissimo tossiche, sono compatibili colla vita delle cellule; anzi in presenza di esse si colorano determinati organi della cellula; nel primo speciali granuli, nel secondo i mitocondri. Anche il bleu Pirrolo permette l'accrescimento dei

tessuti, pur colorando organi della cellula; il violetto di genziana è più tossico.

L'aggiunta al plasma di alcool, di toluolo 4 %, di jodio in quantità anche relativamente grande, non impedisce l'accrescimento (Carrel e Burrows, Cervello e Levi); anzi sembra che in presenza di jodio la coltura divenga più attiva.

Il permanganato potassico invece, anche in soluzioni diluissime (1: 80.000), uccide le cellule in mezz' ora, determinandovi alterazioni caratteristiche. Il nucleo mostra segni di coagulazione già entro pochi minuti; la cromatina si raccoglie in una massa compatta, il succo nucleare si raccoglie in un vacuolo. Poi i mitocondri si trasformano in vescicole, e, se erano stati prima sottoposti ad una colorazione vitale, essi la perdono.

Introducendo nella cella di vetro un tubo capillare contenente la sostanza di cui si volle saggiare l'effetto, si determinerebbe per l'azione di alcune sostanze (adrenalina, nicotina) un'accrescimento in direzione opposta; si otterrebbe cioè un effetto polare negativo (Sanguineti, Fornero); mentre il cloradio eserciterebbe un'azione tropica positiva ⁽¹⁾.

Se adunque la coltura tollera meglio di quel che sarebbe prevedibile la presenza di sostanze che abitualmente non fanno parte del mezzo, è lecito sperare, che le indagini farmacologiche si rivolgano su questa via: di studiare l'azione dei farmaci sui tessuti viventi sottratti all'influenza dell'organismo.

La vita delle colture è comportabile con variazioni nella pressione osmotica, entro limiti più estesi di quel che sarebbe prevedibile.

In massima il plasma ipotonico è più favorevole per la vita e l'accrescimento della coltura di quello ipertonico (Carrel e Burrows).

Le colture in mezzo liquido crescono perfino se il liquido di

⁽¹⁾ Le ricerche riferite sul tropismo si ricollegano a quelle di Cantani, sulla tendenza che hanno le cellule cresciute da due espianti di uno stesso animale, posti l'uno di fronte all'altro ad incontrarsi (blastotropismo positivo); solamente le cellule cresciute da espianti di capsula surrenale tenderebbero a volgersi in direzione opposta al tessuto posto di fronte, il che si spiegherebbe coll'osservazione di Sanguineti sull'azione blastotropica negativa dell'adrenalina.

Locke ha la concentrazione in circa 0,3 % di Cloruro di sodio; ed in soluzione a 0,51 % di *Cl Na* l' accrescimento è più attivo del consueto; in un mezzo ipertonico, sino ad 1,5 % di *Cl Na*; la migrazione è invece lenta; in soluzione di *Cl Na* 1,8 % non si ha accrescimento. Ciò dipenderebbe dalla minor quantità di materiale nutritivo nelle prime, che stimola le cellule a migrare rapidamente in cerca di nutrimento, condizione che provoca l' accumulo di una maggior quantità di prodotti di rifiuto, il quale a sua volta stimola ancor più le cellule a migrare (Hogue).

Però quest' interpretazione non appaga, se si considera che le larve di animali marini, si accrescono più presto in soluzioni ipotoniche, il che non può dipendere da migrazione cellulare più veloce (Jacques Loeb).

E' molto più probabile, che l' accelerazione nell' accrescimento dipenda dall' imbibizione del citoplasma, determinata dalla diminuzione della pressione osmotica.

Trattando colture sviluppate in un mezzo normale, con soluzioni fortemente ipotoniche (0,3 % di *Cl Na*), le cellule si rigonfiano e muoiono rapidamente; l' aggiunta di soluzione 0,45 % non aveva sempre le stesse conseguenze; talora le cellule morivano, altre volte no.

Soluzioni ipertoniche (1,8 % di *Cl Na*) uccidono rapidamente le cellule già sviluppate; in soluzioni 1,5 % le cellule si retraggono, vi si formano lunghi e sottili prolungamenti ramificati, ma poi si ristabiliscono.

È importante, che le varie sostanze aggiunte al mezzo, come pure le variazioni nella pressione osmotica, non determinano un unico tipo di processi degenerativi delle cellule, ma sembrano agire in modo specifico; prima o poi esse conducono alla morte della cellula, quando sorpassano una concentrazione determinata, ma le alterazioni che vi determinano sono diverse nei singoli casi.

I limiti di temperatura entro i quali la vita delle colture è possibile sono estesi; muoiono rapidamente soltanto alla temperatura di 48°; il soggiorno per 45 minuti a 45-47° non la danneggia molto. Per i tessuti di ratto e di topo la temperatura letale è di 3-4 gradi più bassa.

Così le colture resistono per vari giorni al freddo ($-1-4^{\circ}$), e riportate nel termostato si sviluppano normalmente; però se tenute a -10° sopravvivono solamente per 2 ore.

Ma non soltanto la vita, anche l'accrescimento della coltura è compatibile con temperature superiori od inferiori a 39° , che costituisce l'*optimum*; sino ad un massimo di 44° e ad un minimo di 26° .

La velocità di accrescimento è certamente proporzionale alla temperatura; a 28° la divisione mitotica di una cellula impiega da 1 a 2 ore, mentre a 39° da 15 a 20 minuti (pag. 74).

Però queste ricerche sull'influenza della temperatura sull'attività di una coltura non furono ancora compiute con metodo esatto, paragonabile a quello seguito nella determinazione della velocità di accrescimento degli embrioni di animali a sangue freddo in funzione della temperatura (O. Hertwig, Peter, Krogh, ecc.).

In colture sottoposte all'azione di raggi ultravioletti, l'accrescimento delle cellule connettivali sarebbe ostacolato (Levaditi e Matternileh); azione analoga avrebbero radiazioni di idrato di Torio (Amato).

Fra tutte queste osservazioni solamente quelle sull'influenza esercitata sull'attività della coltura dallo spessore e dalla diluizione del plasma, dalla pressione osmotica e dalla concentrazione di elettroliti del mezzo (Burrows, W. Lewis e collaboratori) possono essere senz'altro accettate; le altre numerose, e che furono riferite solamente in parte, dovrebbero essere riprese con maggiore unità d'indirizzo.

L'influenza di agenti fisici e chimici diversi da quelli che abitualmente si esplicano nelle colture deve essere analizzata paragonando fra loro colture a tipo di accrescimento costante. Ed ho detto nelle pagine precedenti quanto sia difficile di ottenerle, quando basta una lieve differenza di volume del frammento espianato od un lieve trauma che questo ha subito, od una differenza nello spessore del coagulo, oppure nella densità del mezzo, per provocare cospicue variazioni nella velocità di accrescimento.

E non risulta che nelle ricerche ricordate si sia di tutto ciò tenuto conto.

2° *Fatti attinenti alla patologia della cellula e dei tessuti desunti da ricerche sulle colture.*

E' ovvio quanto possa essere vantaggioso, per la esatta conoscenza delle intime alterazioni della cellula e delle loro cause, il poterne seguire sotto il microscopio il progressivo svolgimento.

Nel Cap. IV come pure in questo stesso Capitolo fu fatto cenno dei processi regressivi che precedono la morte delle cellule nelle colture.

Altre osservazioni furono compiute nella trasformazione dei condrioconti in grossolane granulazioni, sulla comparsa di vacuoli intracellulari ecc. (G. Levi, W. Lewis).

Varie ricerche furono condotte su colture di tessuti in presenza di batteri della difterite (Levaditi), della tubercolosi (Veratti), del tifo; di quest'ultimo fu studiata l'azione in colture di epitelio intestinale (M. Lewis).

Cellule giganti nelle colture si possono costituire per divisione diretta di un unico nucleo (Macklin), oppure per via diversa, per confluenza di molte piccole cellule, la quale avviene in presenza di spore di licopodio (Lambert).

Anche i processi di riparazione delle ferite possono essere studiate in vitro. Oppel ha stabilito con questo metodo, che la rapida ricostituzione di perdite di sostanza nell'epitelio corneale si deve ad una migrazione attiva dell'epitelio (Cap. III, pag. 37-38). Fra due frammenti di valvola cardiaca coltivata si può formare un tessuto simile a quello di cicatrice, ma nel quale le fibre elastiche non hanno orientazione determinata, come nell'organismo, forse per l'assenza dello stimolo funzionale (Rh. Erdmann). Inoltre confronti interessanti furono istituiti fra la funzione esercitata dal coagulo nelle colture, e l'influenza che ha la presenza di un coagulo sulla cicatrizzazione di una ferita.

Certamente la fibrina favorisce la migrazione delle cellule del connettivo (pag. 44) e perciò affretta il processo di cicatrizzazione (Ruth). Ma Baitsell avrebbe osservato, tanto nelle colture che nelle ferite, un'organizzazione della trama del

coagulo; i filamenti di fibrina si trasformerebbero a poco a poco in fibrille connettivali. Conclusione che è contraddetta da W. Lewis (pag. 53) e va accolta con molta riserva, anche perchè in disaccordo con quanto sappiamo sulla natura e sull'origine delle fibrille dei tessuti di sostegno.

La deduzione importantissima, che Harrison trasse dal fatto constatato nelle colture, che la presenza di uno stroma solido è indispensabile per la migrazione delle cellule (pag. 44), ci spiega la funzione utile, del resto nota, esercitata dalla fibrina sulla cicatrizzazione delle ferite, come pure spiega gli interessanti risultati di Nagéotte, che coll'innesto in un nervo ed in un tendine di un pezzo dello stesso tessuto fissato in alcool, il quale costituisce un substrato consistente agli elementi che emigrano nell'interno di esso, il processo rigenerativo viene ad essere molto affrettato. Analogamente a quanto abbiamo ammesso per le colture (pag. 45 e seg.), nella cicatrizzazione delle ferite, come pure negli innesti, la migrazione delle cellule deve essere stimolata da sostanze, che esercitano un'azione chemiotropica sulle medesime. E' probabile che anche nelle ferite si stabiliscano correnti di diffusione; un polo della cellula è stimolato da prodotti catabolici acidi ad emettere delle propaggini, l'altro polo è eccitato a retrarli da liquidi ricchi di Ossigeno.

Riteniamo adunque, che nella cicatrizzazione delle ferite dell'organismo, come nelle colture, la presenza di un substrato più consistente è condizione necessaria, ma non sufficiente per la migrazione delle cellule.

Da un altro punto di vista ancora il metodo delle colture può contribuire alla conoscenza della Patologia dei tessuti. Noi sappiamo, che cellule di natura differente, come vari elementi del connettivo di sostegno, endoteli vasali ed anche alcune cellule migranti del sangue, non differiscono sempre l'uno dall'altro per caratteri citologici sostanziali; ma nel tessuto normale si riconoscono facilmente per la loro topografia; però quando la normale costituzione di un tessuto incomincia ad alterarsi per un processo infiammatorio, o per le conseguenze di un trauma, i rapporti vicendevoli di quegli elementi sono perturbati al punto, che riesce difficile il riconoscerli. Ricerche faticose compiute nell'ultimo ventennio e specialmente l'im-

piego di colorazioni vitali adeguate, le quali pongono in evidenza in modo elettivo determinati elementi del connettivo (gli istiociti ad es.) ci fecero progredire sensibilmente nell'analisi degli elementi di quel tessuto.

In una coltura ciascuno di quei tipi cellulari acquista nell'emigrare nel coagulo un'impronta particolare; gli endoteli vasali migrano in forma di un reticolo lasso (W. Lewis), i fibroblasti in forma di elementi isolati con lunghi prolungamenti, ramificati e anastomizzati fra loro: le cellule dell'epitelio peritoneale, pleurale e pericardico (mesoteli), come pure l'epitelio tegumentario ed intestinale in forma di membrane, nelle quali i rapporti vicendevoli fra le cellule si conservano quali erano nel tessuto. Ciò prova, che questi diversi tipi cellulari, i quali nel tessuto hanno caratteri strutturali quasi identici, possono essere distinti nella coltura per il diverso modo con cui migrano e per le reciproche connessioni, cioè in grazia alle loro proprietà fisiologiche.

Cosicchè il metodo delle colture viene indirettamente a confermare l'attendibilità di distinzioni istituite dagli studiosi di Istopatologia fra gli elementi riscontrati in tessuti patologici, a seconda della loro origine da elementi fissi del connettivo, oppure da cellule endoteliali dei capillari o da elementi del sangue.

Ed è probabile, che una razionale applicazione del metodo ci farà avanzare ancora nell'analisi della funzione dei vari elementi dei tessuti nei processi morbosi.

Una via alquanto diversa, ma pure promettente, fu seguita da Veratti allo stesso scopo; colture di organi di coniglio adulto furono sezionate in serie, al fine di studiare singoli tipi cellulari sopravvivenenti nell'espianto ed il loro destino nel coagulo.

Sopravvivono più a lungo nelle colture i fibroblasti, i quali formano un sincizio, ed i fagociti istiotigeni (macrofagi, istiociti).

Gli altri elementi del connettivo più differenziati, come pure quelli di origine epiteliale, degenerano.

Sui risultati ottenuti col metodo delle colture da Grawitz e dai suoi allievi, che nelle valvole del cuore coltivate in vitro sorgono cellule « ex novo », anzichè da divisioni di elementi preesistenti, per accumulo di granuli di cromatina dalla so-

stanza fondamentale, non ci intratteremo; essi avrebbero dovuto portare un nuovo argomento in favore della singolare dottrina di Grawitz sull'infiammazione; ma Rh. Erdmann dimostrò sullo stesso materiale, che i nuclei che appaiono nell'espianto provengono sempre da divisione diretta dei nuclei preesistenti.

3° *Coltivazione dei tumori maligni.*

Sin dalle prime ricerche sulle colture, Carrel e Burrows compresero quale importante contributo avrebbe potuto portare il nuovo metodo nello studio dei tumori.

Furono coltivati tumori trasmissibili di ratti e di topi, adenocarcinoma di cane e vari tumori maligni umani; con questi ultimi i risultati furono poco felici, per la proprietà che ha il plasma umano di fluidificare in un breve tempo (pag. 23); però la liquefazione del plasma non era costante, cosicchè fu possibile in qualche caso di compiere il trapianto da una coltura all'altra (Lose e Ebeling).

L'accrescimento dei sarcomi e carcinomi di topi e di ratti è molto attivo; ma l'espianto in serie, non riesce altrettanto bene come per i tessuti normali.

Importanti ricerche furono compiute specialmente da Lambert e Hanes sull'argomento, ma finora la speranza concepita di scoprire per questa via dei fatti attinenti all'etiologia ed alla terapia dei tumori, apparve vana.

Le cellule coltivate mostrano i segni di un attivo metabolismo; vi appaiono granuli di grasso, ma questi non sono certo l'espressione di una degenerazione profonda, che conduca rapidamente alla morte della cellula, bensì di un processo anabolico attivo; tanto è vero che queste cellule possono dividersi; è noto del resto che la comparsa di grasso nelle cellule si produce anche in colture di tessuti normali (pag. 49). Le cellule di carcinoma si spostano in forma di un sottile velo, quelle di sarcoma sempre isolate.

Questa proprietà di emigrare isolate, che le cellule del sarcoma manifestano, spiegherebbe la proprietà di formare dappertutto metastasi. Supposizione che cade di fronte al fatto, che migrazione di cellule isolate si osserva in colture di tessuti

normali. Nelle colture primitive le cellule sarcomatose si palesano più attive di quello del connettivo di adulto; la locomozione è più vivace e la moltiplicazione procede con maggior rapidità; invece in colture secondarie le seconde si accrescono più velocemente delle prime.

Il tessuto di sarcoma di ratto se, dopo essere stato coltivato in vitro per parecchi giorni, viene inoculato in un animale suscettibile, dà luogo allo sviluppo di un nuovo tumore (Volpino, Lambert e Hanes).

Le cellule di sarcoma sono più sensibili all'azione di temperature elevate di quelle dei tessuti normali (pag. 87): così che in una coltura nella quale il tessuto neoplastico non cresce più, gli elementi del connettivo si moltiplicano ancora (Lambert).

Veratti in colture di un tumore misto (adenocarcinoma della mammella di cagna) constatò la proliferazione, tanto degli elementi connettivali, che degli epiteliali.

4° Problemi immunitari studiati col metodo delle colture.

Carrel e Ingebritsen hanno coltivato in scatole di Gabritschewski frammenti di gangli linfatici e di midollo osseo di Cavia in plasma della stessa specie, aggiungendovi come antigene eritrociti lavati di Capra (che non sono emolizzati dal plasma di Cavia); dopo 4 giorni il liquido che si raccoglieva al fondo della scatola aveva un potere emolitico sui globuli di Capra; la comparsa dell'emolisina nella coltura è preceduta da fagocitosi degli eritrociti da parte dei leucociti del tessuto.

Una reazione immunitaria si può dunque produrre indipendentemente dall'influenza dell'organismo, per la sola attività di cellule coltivate in vitro; il che conferma, che il fenomeno immunitario è una reazione cellulare.

Il plasma di pollo in cui sono formate delle isolisine, con un trattamento preliminare immunizzante con eritrociti di pollo, non si presta come terreno di coltura per tessuti di quella specie (Hadda e Rosenthal).

Le citossine che si formano nel plasma di ratto, per effetto di iniezioni di sarcoma di topo, ostacolano l'accrescimento di

un espianto di quel tessuto, mentre esso si coltiva rigogliosamente in plasma di topo normale (Lambert e Hanes).

Gli elementi connettivali della milza si palesano resistenti nelle colture in vitro verso la tossina difterica. Levaditi e Muttermilch lo attribuiscono all'immunità antitossica attiva, indipendente dall'antitossina circolante nell'organismo, che questi elementi possiedono. Esse sono in grado di produrre l'antitossina nella coltura.

RIASSUNTO

Il metodo delle colture trova applicazioni alla Patologia per varie vie: concedendoci la facoltà di modificare le condizioni fisiche e chimiche del mezzo di coltura, di aggiungere sostanze estranee alla sua costituzione e di variare la temperatura, siamo in gradi di analizzare l'influenza di questi fattori sulla struttura e sulla funzione di determinati tessuti, mentre questo non è possibile finchè essi fanno parte dell'organismo.

Inoltre con questo metodo possiamo seguire nella cellula vivente il decorso dei processi regressivi.

Il riconoscimento della parte importante che ha la fibrina per la migrazione delle cellule nelle colture in plasma, ci può spiegare la funzione utile che esercitano i coaguli nella cicatrizzazione delle ferite.

Inoltre con questo metodo possiamo confermare le distinzioni che sono state istituite per altra via fra cellule di origine diversa (fibroblasti, cellule endoteliali dei capillari), che nei processi patologici non sempre possono essere distinte.

Colla coltivazione dei tessuti neoplastici una nuova e feconda via si è aperta allo studio dell'origine e della biologia dei tumori. Infine fu dimostrato che i tessuti coltivati in vitro danno reazioni immunitarie.

Torino, 8 maggio 1922.

INDICE

| | |
|--|--------|
| CAP. I. - Indipendenza fra morte dell'organismo e delle sue parti. Sopravvivenza di organi isolati | Pag. 1 |
| CAP. II. - Sopravvivenza di frammenti di tessuti isolati dall'organismo. Accrescimento di tessuti in vitro | » 11 |
| CAP. III. - La tecnica della coltivazione dei tessuti « in vitro ». Come si svolge la migrazione e l'accrescimento delle cellule in una coltura | » 22 |
| CAP. IV. - Cause che determinano le differenze nei caratteri delle colture. Morte delle cellule coltivate in vitro | » 39 |
| CAP. V. - Comportamento di vari tessuti specificamente differenziati nelle colture « in vitro » | » 52 |
| 1. Tessuto connettivo di sostegno | » 52 |
| 2. Epiteli e ghiandole | » 53 |
| 3. Tessuto muscolare | » 55 |
| 4. Tessuto nervoso | » 57 |
| 5. L'accrescimento dei tessuti coltivati in vitro paragonato a quello dell'organismo | » 63 |
| CAP. VI. - Problemi di morfologia e di fisiologia generale accessibili al metodo delle colture dei tessuti « in vitro » | » 70 |
| 1. Struttura del protoplasma | » 71 |
| 2. Il processo di divisione nelle cellule coltivate « in vitro » | » 74 |
| 3. Contributo che il metodo delle colture dei tessuti « in vitro » ha portato al problema dell'accrescimento | » 76 |
| 4. Contrazioni ritmiche degli elementi muscolari coltivati in vitro ed importanza di tale fatto per la dottrina miogena della contrazione muscolare. | » 78 |
| 5. Conquiste nel campo dell'Istologia del sistema nervoso | » 79 |
| 6. Persistenza dell'individualità cellulare nei sincizi | » 81 |

| | | |
|--|---|---------|
| CAP. VII. - Influenza dell'ambiente sulla biologia dei tessuti coltivati. Applicazioni del metodo delle colture alla Patologia delle cellule e dei tessuti | | Pag. 84 |
| 1. Modificazioni nell'attività e nei caratteri dei tessuti per variazioni dell'ambiente | » | 84 |
| 2. Fatti attinenti alla Patologia della cellula e dei tessuti desunti da ricerche sulle colture | » | 89 |
| 3. Coltivazione dei tumori maligni | » | 92 |
| 4. Problemi immunitari studiati col metodo delle colture | » | 93 |

*L'inito di stampare
il giorno 16 settembre 1922
nella Cooperativa Tipografica Azzoguidi
in Bologna*

CASA EDITRICE NICOLA ZANICHELLI - BOLOGNA

“SCIENTIA,, RIVISTA INTERNAZIONALE DI SINTESI SCIENTIFICA

Si pubblica ogni mese in fascicoli di circa 100 pagine ciascuno

DIRETTORE: EUGENIO RIGNANO

- E' L' UNICA RIVISTA** a collaborazione veramente internazionale.
- E' L' UNICA RIVISTA** a diffusione assolutamente mondiale.
- E' L' UNICA RIVISTA** di sintesi e di unificazione del sapere che tratti delle questioni fondamentali di tutte le scienze: storia delle scienze, matematica, astronomia, geologia, fisica, chimica, biologia, psicologia e sociologia.
- E' L' UNICA RIVISTA** che a mezzo di inchieste fra i più eminenti scienziati e scrittori di tutti i paesi (*Sui principî filosofici delle diverse scienze; Sulle questioni astronomiche e fisiche più fondamentali all'ordine del giorno; Sul contributo che i diversi paesi hanno dato allo sviluppo dei diversi rami del sapere; Sulla questione del vitalismo; Sulla questione sociale; Sulle grandi questioni internazionali sollevate dalla guerra mondiale*), studi tutte le massime questioni che agitano gli ambienti studiosi e intellettuali di tutto il mondo.

Essa ha pubblicato, fra altri, lavori di:

Abbot - André - Arrhenius - Ashley - Bayliss - Beichmann - Benes - Bahlin
Bohn - Bonnesen - Borel - Bottazzi - Bouty - Bragg - Brillouin - Bruni - Cabrera
Carracido - Carver - Castelnovo - Caullery - Chamberlin - Charlier - Ciamician
Claparède - Corbino - Costantin - Crommelin - Cvijic - Darwin - Delage - De Martonne - De Vries - Durkheim - Eddington - Edgeworth - Emery - Enriques
Fabry - Findlay - Fisher - Foà - Fowler - Fredericq - Galeotti - Golgi - Gregory
Guignebert - Hartog - Heiberg - Hinks - Iniguez - Innes - Janet - Jespersen
Kapteyn - Karpinski - Kaye - Kidd - Knibbs - Langevin - Lebedew - Lloid Morgan
Lodge - Loisy - Lorentz - Loria - Lowell - Matruchot - Maunder - Meillet - Moret
Moreaux - Muir - Naville - Pareto - Peano - Perrin - Picard - Pigo - Pians
Poincaré - Puisseux - Rabaud - Reuterskiöld - Rey Pastor - Righi - Rignano
Rudzki - Russell - Rutherford - Sagnac - Sarton - Sayce - Schiaparelli - Seligman
Sergi - Shapley - Sherrington - Smoluchowski - Soddy - Stojanovic - Struycken
Svedberg - Tannery - Teixeira - Thalbitzer - Turner - Vallaux - Vialleton
Vinogradoff - Volterra - Von Zeipel - Webb - Weiss - Westermarck - Wicksell
Willey - Xénopol - Zeeman - Zeuthen e più di cento altri.

“SCIENTIA,, pubblica gli articoli nella lingua dei loro autori, e ad ogni fascicolo è unito *un supplemento contenente la traduzione francese di tutti gli articoli non francesi*. Essa è così completamente accessibile anche a chi conosca la sola lingua francese. (*Chiedere un fascicolo di saggio al Segretario Generale di “Scientia,, Milano inviando, a puro rimborso delle spese di posta e di spedizione, Lire due in francobolli*).

ABBONAMENTO: Italia L. 50 - Estero Frs. 50

UFFICI DELLA RIVISTA: Foro Bonaparte N. 43, Milano

Segretario Generale: Dott. PAOLO BONETTI

Prezzo del presente volume: L. 7,50